



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**« Επίδραση του συνδυασμού *BMP-2* και *GDF-9* στη
στεροειδογένεση σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα »**

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΣΙΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2014

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: Καθηγητής Ιωάννης Ε. Μεσσήνης

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή :

Καθηγητής Ιωάννης Ε. Μεσσήνης

Κωνσταντίνος Νταφόπουλος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μαιευτικής –Γυναικολογίας,
Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Νικόλαος Βαμβακόπουλος, Καθηγητής Βιολογίας - Βασικών επιστημών, Τμήματος
Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Τις θερμές μου ευχαριστίες, θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κ. Ιωάννη Μεσσήνη για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Ηλία Ζιντζαρά για τις πολύτιμες στατιστικές συμβουλές του καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου Μητέρας - Παιδιού, την Αθανασία Σαμαρά και την Ελένη Κατσιάνη για την συνεργασία τους κατά την διάρκεια της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας. Ακόμη, θα ήθελα να δώσω πολλές ευχαριστίες στην συμφοιτήτρια και φίλη μου Κλαίρη Ρήγα με την οποία συνεργαστήκαμε στο εργαστήριο. Τέλος, ευχαριστώ την μητέρα μου καθώς και τους στενούς μου φίλους, για την συμπαράσταση και την υπομονή που έδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

Abstract

Bone morphogenetic protein -2 (BMP-2) and the Growth differentiation factor (GDF-9) belong to the superfamily of transforming growth factor-beta (TGF-B). The BMP-2 acts on the cells of the granulosa cells by affecting the growth of ovarian follicles and the production of steroid hormones. GDF-9 is mainly expressed in follicular oocytes and has an essential role in the regulation of ovarian function.

The effect of the combination of BMP-2 and GDF-9 (BMP-2 + GDF-9) so far has not been studied and there are no reports of their role in terms of steroidogenesis in humans.

The purpose of this study was to determine the effect of the combination of BMP-2 and GDF-9 (BMP-2 + GDF-9) in the steroidogenesis in human granulosa cells. Initially, a determination of the levels of estradiol and progesterone in the culture of granulosa cells held by radioimmunoassay (RIA), the optimal concentration of BMP-2 and GDF-9 for 48 hours. Then, a determination of the levels of estradiol and progesterone in the granulosa cells culture by radioimmunoassay (RIA) after incubation for 48 hours, with the following combinations of hormones: *BMP-2*, *GDF-9*, *BMP-2 + GDF-9*, *BMP-2 + FSH*, *BMP-2 + GDF-9 + FSH*, *GDF-9 + FSH*, *FSH*.

The results showed that the combination of BMP-2 + GDF-9 increases the production of estradiol and causes a relative increase of progesterone relative to the control group. Also, the combination of BMP-2 + GDF-9 gives indications that BMP-2 has inhibitory activity on GDF-9 to the production of estradiol and progesterone. Due to the small number of samples these differences were not statistically significant.

The BMP-2 and GDF-9 factors play a role in steroidogenesis and therefore regulate ovarian function. This study is basic research that needs further investigation to determine the exact role of BMP-2 + GDF-9.

Περίληψη

Η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη -2 (BMP-2) και ο αυξητικός τροποποιητικός παράγοντας (GDF-9) ανήκουν στην υπερικογένεια των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού-β (TGF-B). Η BMP-2 δρα στα κύτταρα της κοκκώδους στιβάδας επηρεάζοντας την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την παραγωγή των στεροειδών ορμονών. Ο GDF-9 εκφράζεται κυρίως στα ωκύτταρα των ωοθυλακίων και έχει ουσιαστικό ρόλο στη ρύθμιση της λειτουργίας της ωοθήκης.

Η δράση του συνδυασμού της BMP-2 και του GDF-9 (BMP-2+GDF-9) μέχρι τώρα δεν έχει μελετηθεί και δεν υπάρχουν αναφορές για το ρόλο τους σε ότι αφορά τη στεροειδογένεση στον άνθρωπο.

Σκοπός της μελέτης ήταν να καθοριστεί η δράση του συνδυασμού της BMP-2 και του GDF-9 (BMP-2+GDF-9) στη στεροειδογένεση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων. Αρχικά έγινε προσδιορισμός των επιπέδων της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στο υπερκείμενο καλλιιεργειών ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων που πραγματοποιήθηκε μέσω ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA), για την βέλτιστη συγκέντρωση της BMP-2 και του GDF-9 για 48 ώρες. Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των επιπέδων της οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στο υπερκείμενο καλλιιεργειών ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων μέσω ραδιοανοσοδοκιμασίας (RIA) μετά την επώαση τους για 48 ώρες, με τους εξής συνδυασμούς ορμονών: *BMP-2*, *GDF-9*, *BMP-2+GDF-9*, *BMP-2+FSH*, *BMP-2+GDF-9+FSH*, *GDF-9+FSH*, *FSH*.

Οι στατιστικές αναλύσεις έδειξαν ότι ο συνδυασμός BMP-2+GDF-9 αυξάνει την παραγωγή οιστραδιόλης και προκαλεί σχετική αύξηση της προγεστερόνης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, από τον συνδυασμό BMP-2+GDF-9 φαίνεται ότι η BMP-2 έχει την τάση να μειώνει την παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης. Ξεκάθαρα συμπεράσματα δεν μπορούν να παρατηρηθούν από τη στατιστική μελέτη καθώς ο αριθμός των δειγμάτων ήταν μικρός.

Η BMP-2 και ο GDF-9 παίζουν σημαντικό ρόλο στη στεροειδογένεση και κατα συνέπεια στη ρύθμιση της λειτουργίας της ωοθήκης. Η παρούσα μελέτη αποτελεί βασική έρευνα που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, για να προσδιοριστεί ο ακριβής ρόλος της BMP-2+GDF-9.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή	8
1.1 Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα	8
1.1.1 Στεροειδογένεση	9
1.2 Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGF-β)	12
1.2.1 Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone morphogenetic proteins (BMPs))	13
1.2.2 Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 2 (BMP-2)	18
1.2.3 Αυξητικός τροποποιητικός παράγοντας 9 (GDF-9)	20
2. Υλικά και μέθοδοι	24
2.1 Τα κοκκώδη κύτταρα	25
2.2 Πειραματικό μέρος	25
2.2.1 Διαδικασία απομόνωσης – καθαρισμού των κοκκωδών κυττάρων	25
2.2.2 Καταμέτρηση και βιωσιμότητα κοκκωδών κυττάρων	26
2.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης της BMP-2 και του GDF-9	26
2.2.4 Καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων με BMP-2	27
3. Αποτελέσματα	28
4. Συζήτηση	44
Βιβλιογραφία	47

1. Εισαγωγή

1.1 Το γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα

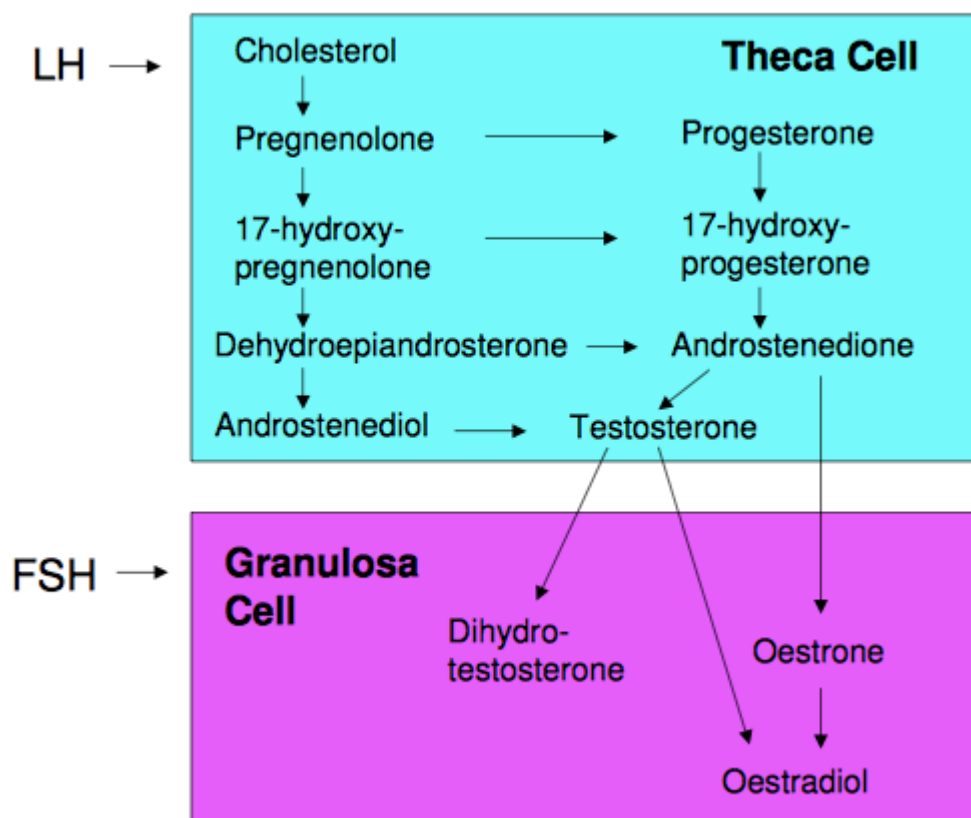
Το αναπαραγωγικό σύστημα της γυναίκας αποτελείται από τις δύο ωοθήκες, τους δύο ωαγωγούς (σάλπιγγες), τη μήτρα και τον κόλπο. Το κύριο όργανο αναπαραγωγής (γονάδες) είναι οι ωοθήκες οι οποίες επιτελούν διπλό ρόλο: την ανάπτυξη του ωαρίου και την έκκριση στεροειδών ορμονών του φύλου (*Vander et al., 2003*).

Οι ωοθήκες είναι ενδοκρινείς αδένες, έχουν σχήμα ελλειψοειδές και αποπλατυσμένο με μήκος 3-6 εκ. η κάθεμία και πλάτος 1.5-3.5 εκ. Η ωοθήκη αποτελείται από α) τον φλοιό ο οποίος περιέχεται από στρώμα και από ωοθυλάκια τα οποία βρίσκονται σε διάφορα εξελικτικά στάδια ή σε ατρησία και από β) τον μυελό που αποτελείται από ινομυώδη ιστό και αγγεία (*Junqueira et al., 2005*).

Η λειτουργία των ωοθηκών είναι περιορισμένη και σχετίζεται με την αναπαραγωγική περίοδο κατά τη διάρκεια ζωής της γυναίκας (*Μεσσήνης, 2005*). Κατά την ενήλικη ζωή της γυναίκας η ωοθηκική λειτουργία εξαρτάται από την συντονισμένη δράση του άξονα υποθάλαμος – υπόφυση – ωοθήκες. Η εκλυτική ορμόνη των γοναδοτροπινών (GnRH, Gonadotropin-Releasing Hormone) παράγεται από τον υποθάλαμο και διεγείρει τα κύτταρα του προσθίου λοβού με αποτέλεσμα την έκκριση των υποφυσιακών γοναδοτροπινών FSH (ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη) και LH (ωχρινοτρόπος ορμόνη) στις ωοθήκες (*Yen et al., 1977*). Η δράση αυτή γίνεται με θετικούς (διεγερτικούς) και αρνητικούς (ανασταλτικούς) μηχανισμούς (feedback) καθώς και με τη βοήθεια τοπικά παραγόμενων ουσιών των ωοθηκών. Οι παραγόμενες ουσίες διαχωρίζονται : στα ωοθηκικά στεροειδή όπως η οιστραδιόλη (E2), η προγεστερόνη (P4), τα ανδρογόνα καθώς και στα ωοθηκικά μη-στεροειδή όπως η ινχμπίνη, η ακτιβίνη, η φολλιστατίνη και ο παράγοντας άμβλυνσης των γοναδοτροπινών (GnSAF) (*Messinis, 2006*).

1.1.1 Στεροειδογένεση

Οι στεροειδείς ορμόνες του φύλου παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της διαφοροποίησης των αναπαραγωγικών ιστών και στη διατήρηση της γονιμότητας (Drummond, 2006). Η στεροειδογένεση αποτελεί κρίσιμη διαδικασία για την επιλογή του ωοθυλακίου και είναι το αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης της FSH και της LH στο πλαίσιο των δύο-κυττάρων δύο-γοναδοτροπινών των ωοθηκών (Messinis 2006). Σύμφωνα με το μοντέλο των δύο-κυττάρων δύο-γοναδοτροπινών (Εικ.1), περιγράφεται ο ρόλος των κυττάρων της θήκης και των κοκκωδών κυττάρων στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών, δίνοντας έμφαση στη συνεργασία μεταξύ των δύο κυτταρικών τύπων (FSH και LH), οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την παραγωγή οιστρογόνων (Drummond, 2006).



Εικ.1: Μοντέλο των δύο-κυττάρων δύο γοναδοτροπινών (Drummond, 2006).

Τα κύτταρα της θήκης διαθέτουν υποδοχείς για την LH, η οποία απελευθερώνεται από την πρόσθια υπόφυση. Κατά την πρόσδεση στον υποδοχέα του, η LH σηματοδοτεί τα κύτταρα της θήκης για την αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων που κωδικοποιούν τα αναγκαία μέτρα για τη μετατροπή της χοληστερόλης σε ανδρογόνα (ανδροστενεδιόνη και τεστοστερόνη) (Miller et al., 2011).

Από την άλλη πλευρά, τα κοκκιώδη κύτταρα διαθέτουν υποδοχείς για FSH, η οποία επίσης απελευθερώνεται από την πρόσθια υπόφυση (Carson et al., 1979). Κατά την πρόσδεση στον υποδοχέα, η FSH σηματοδοτεί τα κοκκιώδη κύτταρα για την αύξηση της μεταγραφής των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα που είναι απαραίτητα για την μετατροπή της θήκης προερχόμενων ανδρογόνων σε οιστρογόνα [17β-οιστραδιόλη (E2) και οιστρόνη].

Στα κύτταρα της θήκης, η χοληστερόλη είτε εσωτερικεύεται από λιποπρωτεϊνικούς υποδοχείς ή συντίθενται de novo. Μια έρευνα έδειξε ότι η χοληστερόλη μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια με STAR (Strauss et al., 1999; Christenson & Strauss 2000; Stocco 2001). Στα μιτοχόνδρια, η χοληστερόλη μετατρέπεται σε πρεγνενολόνη με διάσπαση του κυτοχρώματος P450 χοληστερόλης της πλευρικής αλυσίδας (CYP450sc; CYP11A1;)(Miller, 1988; Hanukoglu, 1992). Στη συνέχεια, η πρεγνενολόνη διαχέεται από τα μιτοχόνδρια στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο όπου μπορεί να μετατραπεί σε προγεστερόνη με 3β-υδροξυστεροειδών αφυδρογονάση (Penning, 1997) ή σε DHEA με 17α-υδροξυλάση-17,20-desmolase (CYP45017α; CYP17A1). Τόσο η HSD3B και το CYP17A1 καταλύει τη μετατροπή της DHEA και της προγεστερόνης για τη δημιουργία ανδροστενεδιόνης (Hanukoglu 1992), αντιστοίχως. Η ανδροστενεδιόνη μπορεί είτε να μετατραπεί σε τεστοστερόνη με 17β-υδροξυστεροειδούς αφυδρογονάσης (HSD17B) εντός του κυττάρου θήκης ή διαχέεται εντός των κοκκιωδών κυττάρων. Στα κοκκιώδη κύτταρα, η αρωματάση (CYP450arom ; CYP19A1) μπορεί να μετατρέψει ανδροστενεδιόνη σε οιστρόνη και η τεστοστερόνη σε E2 (Hanukoglu 1992). Επιπλέον, τα κοκκιώδη κύτταρα μπορεί να μετατρέψουν την οιστρόνη σε E2 μέσω της δράσης του HSD17B (Penning, 1997). Η E2 είναι η πιο ισχυρή μορφή των οιστρογόνων στα θηλυκά της αναπαραγωγής. Ωστόσο, μετά τη σύνθεση τους, η E2 μπορεί να μεταβολιστεί περαιτέρω σε 2-hydroxyestradiol με CYP1A1 / 2 και CYP3A4, ή σε 4-hydroxyestradiol με CYP1B1 (Hayes et al., 1996, Tsuchiya et al., 2005). Αυτές οι τροποποιήσεις οδηγούν σε

απενεργοποίηση της E2 και οι περαιτέρω τροποποιήσεις πιστεύεται ότι οδηγούν σε κυτταρική βλάβη (*Tsuchiya et al., 2005*).

Αρκετές είναι οι χημικές ουσίες που έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την σύνθεση και το μεταβολισμό των ορμονών των ωοθηκών στεροειδών του φύλου, μεταβάλλοντας την έκφραση και την καταλυτική δραστηριότητα αυτών των ενζύμων. Η ενδοκρινική διαταραχή συμβαίνει όταν η ορμόνη δεν είναι πλέον διαθέσιμη για να δεσμεύσει τον υποδοχέα της και αποτυγχάνει να διατελέσει τη φυσιολογική λειτουργία του (*Miller et al., 2011*).

Εκτός από αυτά τα ένζυμα που προαναφέρθηκαν και άλλοι παράγοντες συντελούν στην στεροειδογένεση όπως το σύστημα ινχιμπίνης/ακτιβίνης, οι IGFs (IGF1 και IGF2) και οι δεσμευτικές πρωτεΐνες αυτών IGFBPs (*Μεσσήνης, 2005*).

1.2 Αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (Transforming growth factor- β ή TGF-β)

Ο αυξητικός παράγοντας μετασχηματισμού β (TGF-β) ανήκει σε μια υπερικογένεια αυξητικών παραγόντων. Ανάλογα με τον τύπο και το μέρος του κυττάρου που επιδρούν τα μέλη του TGF-β, τα αποτελέσματα είναι διαφορετικά. Τα μέλη του TGF-β είναι πολυλειτουργικές σηματοδοτικές πρωτεΐνες και σε αυτήν ανήκουν: α) οι διάφορες ισομορφές του TGF-β (TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3), β) οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs), οι οποίες αποτελούνται από 20 μέλη, γ) οι αυξητικοί παράγοντες διαφοροποίησης (GDFs), που ανήκουν τουλάχιστον 9 μέλη (*Knight et al., 2006*), δ) οι ακτιβίνες, ε) η αντιμυλλέρια ορμόνη, στ) οι ορμόνες Nodal και ζ) άλλοι δομικοί παράγοντες αντίστοιχα στον κάθε οργανισμό (*Massague 1998*).

Ο ρόλος τους είναι καθοριστικός τόσο στην εμβρυική όσο και στην ενήλικη ζωή, εφ' όσον συμμετέχουν στην ανάπτυξη, την συντήρηση, την αναγέννηση των διαφόρων ιστών και οργάνων (*Esch et al., 1987; Hogan 1996; Reddi 1998; Reddi 2005; Piek et al., 1999*) καθώς και την ομοιοστάση των ιστών (*Piek et al., 1999*). Επίσης αυτοί οι παράγοντες ρυθμίζουν την κυτταρική μετανάστευση, τη σηματοδότηση, τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση και τον θάνατο καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής ενός οργανισμού (*Massague et al., 2000*).

Συγκεκριμένα, οι TGF-β επάγουν έντονα εξωκυττάρια σύνθεση και έκφραση της ιντεγκρίνης, καθώς επίσης είναι και ρυθμιστές ανοσοαποκρίσεων. Οι BMPs είναι ισχυροί επαγωγείς του σχηματισμού οστών και χόνδρων και διαδραματίζουν σημαντικό αναπτυξιακό ρόλο στην επαγωγή του κοιλιακού μεσοδέρματος, στη διαφοροποίηση του νευρικού ιστού καθώς και στην οργανογένεση. Οι ακτιβίνες οι οποίες φαίνονται ως ενεργοποιητές της ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (FSH), είναι γνωστό ότι προάγουν την ερυθροποίηση και συμβάλλουν στην επιβίωση των νευρικών κυττάρων. Η δυσλειτουργία όμως αυτών των παραγόντων έχει ενοχοποιηθεί σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως στην κυστική ίνωση, στην ρευματοειδή αρθρίτιδα, και στην καρκινογένεση (*Piek et al., 1999*).

Ο ρόλος του TGF-β στην ανάπτυξη των ωοθυλακίων

Κατά την ωοθυλακική ανάπτυξη κάθε ωοθυλάκιο έχει μία μοναδική βιοχημική σύνθεση στην κάθε χρονική στιγμή. Μελέτες έδειξαν ότι υπάρχει ένας ακριβής συντονισμός μεταξύ της ανάπτυξης και της ωρίμανσης του ωοκυττάρου και των παρακείμενων σωματικών κυττάρων, προκειμένου να παραχθεί ένα ωοκύτταρο το οποίο είναι πλήρως ικανό να υποστεί την γονιμοποίηση και την ανάπτυξη του εμβρύου. Εκτός από την ενδοκρινική σηματοδότηση του άξονα υποθάλαμου - υπόφυσης -ωοθήκης, είναι πλέον προφανές ότι το ίδιο το ωοκύτταρο επηρεάζει σημαντικά το μικροπεριβάλλον του αναπτυσσόμενου ωοθυλακίου. Αυτό γίνεται μέσω παρακρινικών και αυτοκρινικών μηχανισμών, με την ωρίμανση του ίδιου του ωαρίου, καθώς και την διαφοροποίηση και το ποσοστό ωορρηξίας. Αρκετές από τις ρυθμίσεις που προαναφέρθηκαν ευθύνονται τα μέλη του TGF-β. Ο ακριβής ρόλος όλων των μελών του TGF-β δεν έχει διευκρινιστεί ακόμη στην ανθρώπινη ωοθήκη. Πιθανολογείται ότι κάτι τέτοιο θα προωθήσει νέες θεραπευτικές εφαρμογές για τη διαχείριση της γονιμότητας, καθώς και την κατανόηση για το πώς πρέπει να εκτιμηθεί καλύτερα η ποιότητα των ωαρίων (*Juengel et al., 2004c*).

Επίσης, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι οι οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (BMPs) και ο αυξητικός τροποποιητικός παράγοντας 9 (GDF-9) παίζουν ρόλο κλειδί στην ωοθυλακική ανάπτυξη καθώς και στην πραγματοποίηση της ωοθυλακιόρρηξίας (*Paradis et al., 2010*).

1.2.1 Οστικές μορφογενετικές πρωτεΐνες (Bone morphogenetic proteins (BMPs))

Οι BMPs ανήκουν στην οικογένεια των TGF-β παραγόντων (*Knight et al., 2006*). Ο ρόλος τους εμφανίζεται στην αναπτυξιακή διαδικασία διαφόρων ιστών και οργάνων (*Merino et al., 1999*). Με την δράση τους ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, την διαφοροποίηση, την χημειοταξία και την απόπτωση σε ποικίλους κυτταρικούς τύπους όπως στα επιθηλιακά, μεσεγχυματικά, αιμοποιητικά και νευρικά κύτταρα (*Zeisberg et al., 2008*). Οι BMPs μπορεί να επιδρούν είτε άμεσα στα κύτταρα

στόχους είτε έμμεσα σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζουν την κυτταρική λειτουργία (Macias *et al.*, 1997). Σημαντικός επίσης είναι ο ρόλος των BMPs στα οστά, στον χόνδρο, στα δόντια, στους νεφρούς, στο δέρμα, στα μαλλιά, στους μυς, στην ανάπτυξη του αιμοποιητικού και νευρικού συστήματος, στον μεταβολισμό του σιδήρου και στην αγγειακή ομοιόσταση (Derynck *et al.*, 2008).

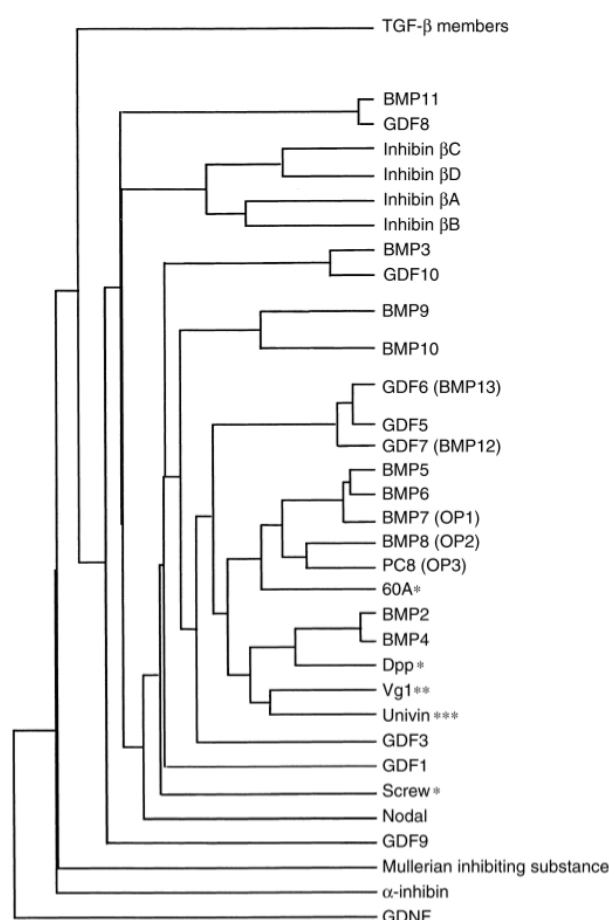
Δομή των BMPs

Η δομή των BMPs είναι όμοια με αυτή των υπολοίπων μελών της υπερικογένειας των TGF-β (Lin *et al.*, 2003). Η αρχική μορφή της λειτουργικής πρωτεΐνης των BMPs πριν εκκριθεί από τα κύτταρα είναι μία μεγάλη προ-πρωτεΐνη, η οποία αποτελείται από ένα μοναδικό σηματοδοτικό πεπτίδιο (N- τελικό άκρο), την προ-περιοχή και την ώριμη περιοχή (C- τελικό άκρο). Στο σηματοδοτικό πεπτίδιο περιέχεται το σήμα που θα οδηγήσει την πρωτεΐνη στο εκκριτικό μονοπάτι. Έτσι πριν εκκριθεί η προ-πρωτεΐνη, απαιτείται η απομάκρυνση του σηματοδοτικού πεπτιδίου. Έπειτα, ειδικά πρωτεολυτικά ένζυμα διασπούν τη διμερή προ-πρωτεΐνη στην περιοχή RXXR με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας βιολογικά ενεργούς διμερισμένης πρωτεΐνης, η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα (Miyazono *et al.*, 1988). Η ώριμη μορφή των BMPs περιέχει επτά συντηρημένα κατάλοιπα κυστεΐνης. Τα έξι από αυτά συμμετέχουν στο σχηματισμό του κόμπου κυστίνης μιας μοναδικής τρισδιάστατης δομής για το μόριο. Το ένα συντηρημένο κατάλοιπο κυστεΐνης που δεν συμμετέχει στο σχηματισμό του κόμπου κυστίνης δημιουργεί μία μοναδική δισουλφιδική γέφυρα μεταξύ των δύο υπομονάδων για το σχηματισμό του ομοδιμερούς (Wang *et al.*, 1990; Israel *et al.*, 1992; Schlunegger *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 1994; Griffith *et al.*, 1996; Vitt *et al.*, 2001).

Σε κάποιες περιπτώσεις που συνεκφράζονται πολλά διαφορετικά μέλη των BMPs μπορεί να δημιουργηθούν ετεροδιμερή αντί των ομοδιμερών που προαναφέρθηκαν. Αυτά έχουν το χαρακτηριστικό να συνενώνονται με μη ομοιοπολικό δεσμό και έχουν υψηλότερη βιολογική δραστηριότητα απ' ότι τα αντίστοιχα ομοδιμερή (Aono *et al.*, 1995; Kusomoto *et al.*, 1997).

Οι BMPs αποκτούν την ιδιότητα να είναι ανθεκτικές στη θερμότητα, τη μετουσίωση και στις ακραίες τιμές pH λόγω της ύπαρξης πολλών συντηρημένων καταλοίπων κυστεϊνών (Wozney *et al.*, 1998).

Τέλος, χαρακτηριστικό των θηλαστικών είναι ότι η δομή των BMPs είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένη καθ' όλη την εξέλιξη. Βασιζόμενοι στην ομολογία της αλληλουχίας των αμινοξέων, η υποοικογένεια των BMPs υποδιαιρείται σε επιμέρους υποομάδες. Οι υποομάδες που ταυτοποιήθηκαν είναι οι εξής: BMP-2/-4, BMP-3, BMP-7/OP-1, BMP-9/BMP-10, BMP-11/GDF-8, BMP-12/BMP-13/BMP-14 και BMP-15 (Reddi *et al.*, 1998).



Εικ.2: Φυλογενετικό δένδρο μεταξύ των μελών των BMPs (Ducy *et al.*, 1999)

Υποδοχείς των BMPs

Οι BMPs για να δράσουν προσδένονται σε ειδικούς διαμεμβρανικούς υποδοχείς των κυττάρων στόχων. Γενικά οι υποδοχείς αποτελούνται από μία εξωκυττάρια περιοχή πρόσδεσης στην οποία εξειδικευμένα θα προσδεθεί το μόριο-προσδέτης, μία

μοναδική διαμεμβρανική περιοχή και μία ενδοκυττάρια περιοχή με ειδικότητα κινάσης σερίνης/θρεονίνης.

Στην υποοικογένεια των BMPs το σύμπλεγμα των υποδοχέων αποτελείται από τους τύπου I (BMPR-IA και BMPR-IB) και τύπου II (BMPR-II) υποδοχείς (Derynck 1994; Massague et al., 2000; Miyazono et al., 2001). Στους υποδοχείς τύπου I, ανήκουν επτά είδη υποδοχέων [activin receptor- like kinases 1-7 (ALK1-7)]. Οι υποδοχείς αυτοί βάση της δομής και της λειτουργίας τους κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες: την BMPR-I ομάδα που περιέχει ALK-3(BMPR-IA) και ALK-6(BMPR-IB), την ALK-1 ομάδα που περιέχει την ALK-1 και ALK-2 και την TβR-I ομάδα που περιέχει την ALK-4/ActR-IB, την ALK-5/TβR-I και την ALK-7 (Kawabata et al., 1998). Οι υποδοχείς τύπου II κατηγοριοποιούνται σε πέντε επιμέρους υποδοχείς: οι BMPR-II που είναι ειδικοί για τις BMP, οι ActR-IIA και ActR-IIB οι οποίες είναι ειδικές για τις ακτιβίνες, τις μυοστατίνες και κάποιες BMP, οι AMHR-II με ειδικότητα για την αντιμυλλέρια ορμόνη και οι υποδοχείς TGFR-II που είναι ειδικοί για τον TGFβ (ten Dijke et al., 1993; Yu et al., 2005).

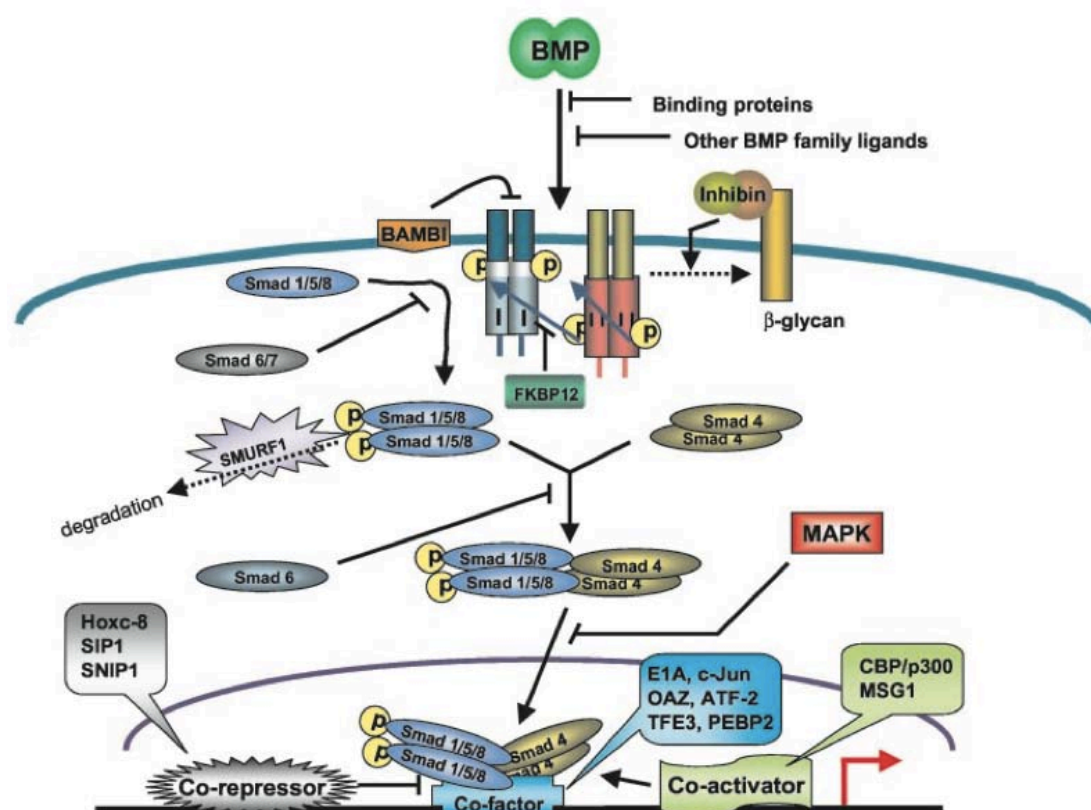
Οι υποδοχείς των BMPs κατά την πρόσδεση των πρωτεϊνών δημιουργούν ετεροδιμερή σύμπλοκα. Ο σχηματισμός αυτός οφείλεται στο ότι οι BMPs, ως μόρια προσδέτες, εμφανίζουν υψηλότερη συγγένεια για τα ετεροδιμερή έναντι των μονομερών συμπλόκων (ten Dijke et al., 1993).

Υπάρχουν δυο θεωρίες σε ότι αφορά το πρότυπο σχηματισμού του συμπλέγματος του ολιγομερισμού των BMPs υποδοχέων. Η πρώτη υποστηρίζει ότι είναι όμοιο με αυτό της υπεροικογένειας των TGF-β ενώ η δεύτερη ακολουθεί τελείως διαφορετική πορεία (πρότυπο) ολιγομερισμού. Σύμφωνα με την πρώτη άποψη, το μόριο-προσδέτης συνδέεται με τον τύπου II υποδοχέα και μετά ενεργοποιεί τον τύπου I ενώ κατά τη δεύτερη θεωρία πρώτα το μόριο-προσδέτης συνδέεται στον τύπου I και μετά ενεργοποιεί τον τύπου II (Liu et al., 1995; Nohe et al., 2002). Μη λαμβάνοντας υπόψιν τον τρόπο ολιγομερισμού, το μόριο-προσδέτης αλληλεπιδρά με μεγάλη ειδικότητα σε ολόκληρο το σύμπλεγμα ώστε να επάγει την περαιτέρω ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού (Kawabata et al., 1998; Massague et al., 1998). Ο ολιγομερισμός οδηγεί στην φωσφορυλίωση της ενδοκυττάριας περιοχής του τύπου II (τύπου I) υποδοχέα που με τη σειρά του φωσφορυλιώνει την περιοχή κινάσης του

τύπου I (τύπου II) υποδοχέα. Η φωσφορυλίωση γίνεται στην ενδοκυττάρια GS παραμεμβρανική περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε κατάλοιπα γλυκίνης και σερίνης (Wrana *et al.*, 1992; Franzen *et al.*, 1993). Η φωσφορυλίωση του συμπλέγματος οδηγεί στην μετέπειτα μεταφορά του σήματος στα ενδοκυττάρια σηματοδοτικά μόρια με αποτέλεσμα να ενεργοποιείται ανάλογα με την κυτταρική σειρά, το «κανονικό» ή το «μη κανονικό» σηματοδοτικό μονοπάτι των BMPs (Nohe *et al.*, 2002).

Σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται μέσω των BMPs

Κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα των BMPs, ενεργοποιούνται δύο ειδών σηματοδοτικά μονοπάτια: το «κανονικό» που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του μονοπατιού της οικογένειας των Smad πρωτεϊνών και το «μη κανονικό» σηματοδοτικό μονοπάτι που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του BMP-μιτογόνου ενεργοποιητή των πρωτεϊνικών κινάσων (BMP-mitogen-activated protein kinase ή BMP-MAPK) (Heldin *et al.*, 1997).



Εικ.3: Σηματοδοτικά μονοπάτια του BMP (Shimasaki *et al.*, 2004)

1.2.2 Οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 2 (BMP-2)

Η οστική μορφογενετική πρωτεΐνη 2 (BMP-2) είναι ένα μέλος της υπερικογένειας του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού TGF- β και ο ρόλος του είναι α) να επάγει το σχηματισμό των οστών β) να βοηθάει στην αναγέννησή τους καθώς και δ) να προωθεί τα πρώτα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης σε σπονδυλωτά και σε ασπόνδυλα (Reddi *et al.*, 1998). Μελέτες έδειξαν ότι, η ανεπάρκεια της BMP-2 οδηγεί σε εμβρυϊκή θνησιμότητα μεταξύ της ημέρας 7,5 και 9,5 της κύησης (Zhang & Bradley, 1996).

Δομή και μηχανισμός της BMP-2

Η BMP-2 συντίθεται ως μία προ-πρωτεΐνη η οποία γλυκοσυλιώνεται, διασπάται από πρωτεολυτικά ένζυμα και διμερίζεται για να δώσει την ώριμη ομοδιμερή προ-πρωτεΐνης που αποτελείται από 114 C-τελικά άκρα. Όπως και όλα τα μέλη της οικογένειας TGF- β , η BMP-2 περιέχει το συντηρημένο μοτίβο αναδίπλωσης της κυστίνης (McDonald & Hendrickson, 1993; Murray-Rust *et al.*, 1993). Η αλληλουχία που προηγείται της κυστίνης της BMP-2, έχειδειχθεί ότι εμπλέκεται στην πρόσδεση της ηπαρίνης (Ruppert *et al.*, 1996). Σε αντίθεση με τους TGF- β παράγοντες, αυτή η αλληλουχία δεν συνδέεται ομοιοπολικά με την πρωτεΐνη πυρήνα με δισουλφιδική γέφυρα. Θα πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι, η αλληλουχία αμινοξέων της BMP-2 δείχνει 92% ταυτόσημη με εκείνη της BMP-4 (Newfeld *et al.*, 1997).

Η BMP-2 μεταδίδει σήματα εντός του κυττάρου με σύνδεση και ολιγομερισμό δύο τύπων υποδοχέων (Reddi, 2005). Ενδεχομένως, δύο τύποι 1 και δύο τύποι 2 αυτών των αλυσίδων αλληλεπιδρούν με ένα μόριο BMP-2 κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα, όπως και στο σύστημα του υποδοχέα TGF- β (Wrana *et al.*, 1994).

Μελέτες

Σε καλλιέργειες που έγιναν σε κοκκώδη κύτταρα προβάτων, έδειξαν ότι η παρουσία της BMP 2 αύξησε την οιστραδιόλη και την η ινχιβίνη Α καθώς τα κοκκώδη κύτταρα διαφοροποιόντουσαν. Επομένως, συνεπάγεται το συμπέρασμα ότι οι υποδοχείς BMP

είναι παρόντες στις ωοθήκες των προβάτων και ότι BMPs μπορεί να έχει ένα ρόλο στη διαφοροποίηση των κοκκιωδών κυττάρων, ενισχύοντας την δράση της FSH (*Souza et al., 2002*).

Στην όρνιθα και στα ποντίκια , ύστερα από καλλιέργειες κοκκιωδών κυττάρων έδειξε ότι η BMP-2 αναστέλλει την παραγωγή της προγεστερόνης (*Haugen et al., 2010*) όπως επίσης και στα κοκκώδη κύτταρα των χοίρων και των βοοειδών (*Brankin et al., 2005*).

Στον άνθρωπο, σε καλλιέργειες κοκκιωδών κυττάρων, έδειξαν ότι η BMP-2 που υπάρχει στα κοκκώδη κύτταρα στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια μειώνει την έκφραση της Star πρωτεΐνης και έτσι καταστέλλεται η παραγωγή της προγεστερόνης. Όσον αφορά την οιστραδιόλη, η BMP-2 έδειξε ότι επάγει την αρωματάση στα αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια και εμφανίζεται αύξηση της οιστραδιόλης (*Shi et al., 2010*).

1.2.3 Αυξητικός τροποποιητικός παράγοντας 9 (Growth differentiation factor 9, GDF-9)

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990, εντοπίστηκε για πρώτη φορά ο αυξητικός παράγοντας 9 (GDF-9) ως ένα μέλος της οικογένειας του TGF (*McPherron et al., 1993*). Ο GDF-9 εκφράζεται κυρίως στα ωοκύτταρα των ωοθυλακίων (*McGrath et al., 1995*). Σύμφωνα με γονιδιακές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια δείχνει ότι ο ουσιαστικός ρόλος του GDF-9 είναι στη ρύθμιση της λειτουργίας της ωοθήκης. Η ανεπάρκεια του GDF-9 στα θηλυκά ποντίκια έδειξε ότι προκαλεί στειρότητα και εμφανίζει αποτυχία της ωρίμανσης των ωοθυλακίων (εκτός του σταδίου του πρωτογενούς ωοθυλακίου) με αποτέλεσμα την υπογονιμότητα. Στα αρσενικά ποντίκια, η ανεπάρκεια του GDF-9 δεν επέφερε καμιά αλλαγή και τα ποντίκια παρέμειναν γόνιμα (*Dong et al., 1996*). Επίσης, ο GDF-9 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς έρευνες σε τρωκτικά δείχνουν ότι παίζει σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων καθώς και στην εξέλιξη των κυττάρων της θήκης (*Shimasaki et al., 2004*). Ωστόσο, ο ρόλος του στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της θήκης δεν έχει διευκρινισθεί πλήρως.

Σε ορισμένα πρώτιστα, τα κοκκιώδη κύτταρα καθώς και το ωοκύτταρο εκφράζουν το mRNA του GDF9 και την πρωτεΐνη του (*Duffy, 2003*). Το πρότυπο έκφρασης του GDF-9 διαφέρει μεταξύ των ειδών και συγκεκριμένα παρατηρήθηκε για πρώτη φορά σε αρχέγονα ωοθυλάκια από πρόβατα, βοοειδή, γάτες και χάμστερ (*Bodensteiner et al, 1999; Eckert et al, 2002; Wang & Roy, 2004*) και σε πρωτογενή ωοθυλάκια στους αρουραίους, στα ποντίκια και στους ανθρώπους (*Dube et al., 1998; Laitinen et al., 1998*). Σε πρόβατα, το mRNA του GDF9 ήταν παρόν σε γεννητικά κύτταρα πριν από τον σχηματισμό του ωοθυλακίου και το mRNA και η πρωτεΐνη του GDF9 εντοπίστηκε σε ωοκύτταρα που δεν είχαν πλήρως κοκκιώδη κύτταρα (*Juengel et al., 2004b*).

Επίσης, ο GDF-9 είναι συνδεδεμένος με το ομόλογο του, GDF-9B / μορφογενετική οστική πρωτεΐνη-15 (BMP-15) και εκφράζονται στην ανθρώπινη ωοθήκη από το πρωτογενές στάδιο και μετά (*Aaltonen et al., 1999; Teixeira et al., 2002*).

Σηματοδότηση του GDF-9

Ο GDF9 μπορεί να παραχθεί από τα κοκκιώδη κύτταρα σε ορισμένα είδη (*Prochazka et al., 2004*). Η σηματοδότηση αρχίζει όταν ο GDF-9 ενεργοποιεί τους παράγοντες μεταγραφής SMAD2 / 3 από τα κοκκιώδη κύτταρα με την ενεργοποίηση του υποδοχέα BMP τύπου II (BMPRII) και του υποδοχέα τύπου I υποδοχέας-κινάσης που μοιάζει με αυτόν της ακτιβίνης 5 (ALK5) (*Kaivo et al., 2003*). Ωστόσο, οι αλλαγές των κυττάρων θήκης ALK5 mRNA κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ωοθυλακίων και το ακριβές σύστημα της ενδοκυτταρικής σηματοδότησης που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα της θήκης δεν έχουν ακόμη αξιολογηθεί.

Μελέτες

Ο ρόλος του GDF9 είναι σημαντικός στην πρόωμη ανάπτυξη των ωοθυλακίων και στη γονιμότητα όπως δείχνουν οι μελέτες σε μεταλλαγμένα ποντίκια (*Carabatsos et al., 1998*) και σε πρόβατα (*Hanrahan et al., 2004*). Όσον αφορά τα κύτταρα της θήκης, οι ωοθήκες από τα ποντίκια που είχαν έλλειψη του GDF-9 μπλόκαραν τα ωοθυλάκια στο πρωτογενές στάδιο που σαν συνέπεια είχε την αποτυχία σχηματισμού του στρώματος της θήκης (*Elvin et al., 1999*).

Ο GDF-9 ελέγχει την έκφραση αρκετών γονιδίων των ωαρίων που ρυθμίζουν την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και προάγει τον πολλαπλασιασμό των κοκκιωδών κυττάρων. Φαίνεται ότι ο GDF-9 σχετίζεται στενά με τους BMP ωαρικούς αυξητικούς παράγοντες, αφού χρησιμοποιούν τους ίδιους υποδοχείς (BMPRII) (*Vitt et al., 2002*), και στα ποντίκια ο τρόπος έκφρασης του GDF-9 συμπίπτει με αυτόν του BMP-15 (*Dube et al., 1998*). Επομένως, οι αυξητικοί παράγοντες που εκκρίνονται από το ωάριο παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των προκοιλοτικών ωοθυλακίων μέσω της επίδρασης τους στα περιβάλλοντα κοκκώδη κύτταρα και στα κύτταρα της θήκης (*Vanderhyden, 2003*).

Σε μελέτες που έγιναν *in vitro*, έδειξαν ότι τα ανθρώπινα ωάρια, εκφράζουν GDF-9 και BMP-15 σε υψηλά επίπεδα, και ότι ο GDF-9 ενεργοποιεί την ανάπτυξη των προκοιλοτικών ωοθυλακίων (*Hreinsson, et al., 2002*). Επίσης, έχει βρεθεί ότι η δυσλειτουργία στην έκφραση του GDF-9 σχετίζεται με το σύνδρομο πολυκυστικών

ωοθηκών στις γυναίκες (Teixeira et al., 2002). Αυτά τα πειράματα οδήγησαν στην αντίληψη ότι ο προερχόμενος από το ωάριο GDF-9 είναι αναντικατάστατο μόριο για τη μετάβαση του πρωτογενούς σε δευτερογενές ωοθυλακίου, πιθανότατα λόγω της ικανότητας του να διεγείρει τον πολλαπλασιασμό και τον τρόπο διάταξης των κοκκιωδών κυττάρων (Teixeira et al., 2002).

Καθώς το ωοθυλάκιο με άντρο αναπτύσσεται, οι GDF-9 και BMP-15 που παράγονται στο ωάριο, λειτουργούν σαν σήματα μορφογενετικής διαφοροποίησης για τη δημιουργία των διαφορετικών από λειτουργικής πλευράς τύπων κοκκιωδών κυττάρων, ανάλογα με τη θέση τους σε σχέση με το ωάριο. Οι λειτουργικές αυτές διαφορές γίνονται εξαιρετικά σημαντικές καθώς τα ωοθυλακικά κύτταρα και το ωάριο ετοιμάζονται για την ωοθυλακιορρηξία.

Το ωάριο είναι υπεύθυνο για την έκκριση των αυξητικών παραγόντων της οικογένειας του TGF- β , που περιλαμβάνει τον GDF-9 ο οποίος υποστηρίζει την φαινοτυπική διαφοροποίηση των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου και ασκεί μαζί με την βοήθεια των BMPs επιτρεπτική δράση ώστε τα κύτταρα του δίσκου να ανταποκριθούν στο ωορρηκτικό ερέθισμα (Eppig et al., 2002).

Μελέτες σε κοκκώδη κύτταρα ποντικών έδειξε ότι ο GDF-9 αυξάνει την παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης (Vitt et al., 200) και όταν βρίσκεται σε συνδιασμό με την FSH (πειράματα σε ποντίκια και βοοειδή) φίνεται να γίνεται αναστολή της παραγωγής της προγεστερόνης (Vitt et al., 200; Spicer et al., 2006).

Πειραματικές θεραπείες

Η θεραπεία με GDF9, σε πειράματα ποντικών (Solovyeva et al., 2000) και ανθρώπου (Yamamoto et al., 2002) έδειξε ότι αναστέλλεται η παραγωγή προγεστερόνης. Ωστόσο, η θεραπεία με GDF9 διαφέρει στα διάφορα είδη των κυττάρων της θήκης καθώς στον άνθρωπο μειώνει την φορσκολίνη η οποία προκαλείται από την παραγωγή ανδρογόνων από τα ανθρώπινα κύτταρα της θήκης (Yamamoto et al., 2002), ενώ στα ποντίκια αυξάνεται η παραγωγή ανδρογόνων από τα κύτταρα θήκης των ποντικών (Solovyeva et al., 2000).

Αντι-αποπτωτική δράση του GDF-9

Μελέτες έδειξαν ότι ο GDF-9 έχει αντι-αποπτωτική δράση στα αρχόμενα κοιλοτικά ωοθυλάκια καθώς επίσης και στα κοκκιώδη κύτταρα αφού τα προστατεύει από το να υποστούν απόπτωση μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης 3-κινάσης / Akt. Επίσης, ο GDF-9 συμβάλλει στην επιβίωση των ωοθυλακίων και στην ανάπτυξή τους (από το στάδιο πριν τη δημιουργία άντρου μέχρι το στάδιο των αρχόμενων κοιλοτικών ωοθυλακίων) μέσω της καταστολής της κυτταρικής απόπτωσης και της ατρησίας των κοκκιωδών κυττάρων (*Orisaka et al., 2010*).

2. Υλικά και μέθοδοι

Σκοπός

Η παρούσα ερευνητική μελέτη είχε ως στόχο τη μελέτη της επίδραση του συνδιασμού της BMP-2 και του GDF-9 στη στεροειδογένεση των ωχρινοποιημένων κοκκωδών κυττάρων.

2.1 Τα κοκκώδη κύτταρα

Ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα 3 γυναικών ηλικίας 20 έως 40 ετών χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της στεροειδογένεσης έπειτα από τη δράση της BMP-2 και του GDF -9 σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων. Τα κοκκώδη κύτταρα απομονώνονταν από το ωοθυλακικό υγρό των γυναικών που υποβάλλονταν σε πρωτόκολλα της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής. Στις γυναίκες αυτές γίνονταν πολλαπλή ωοθυλακική διέγερση χορηγώντας ανασυνδυασμένη FSH, GnRH αγωνιστή καθώς και για την τελική ωρίμανση των ωοθυλακίων χορηγούνταν hCG, 36 ώρες πριν την ωοληψία. Αξίζει να επισημάνουμε ότι η χρησιμοποίηση του ωοθυλακικού υγρού των γυναικών γίνονταν με την πλήρη συγκατάθεσή τους.

2.2 Πειραματικό μέρος

Η συλλογή του ωοθυλακικού υγρού πραγματοποιούνταν με την τεχνική της ωοληψίας. Τα κοκκώδη κύτταρα που εμπεριέχονταν σε αυτό απομονώνονταν με τη μέθοδο της καθίζησης, ακολουθώντας το πρωτόκολλο του Hillier (*Hillier 1991*). Μετά από την κατάλληλη επεξεργασία του δείγματος, απομακρύνονταν με διαδοχικά ξεπλύματα τα στοιχεία του αίματος και οι υπόλοιπες προσμίξεις του ωοθυλακικού υγρού (καθαρισμός των κυττάρων) και έπειτα γίνονταν η καθίζηση μόνο των επιθυμητών κοκκωδών κυττάρων (καθίζηση) (*Hillier et al., 1991*). Οι παραπάνω διαδικασίες πραγματοποιήθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες.

2.2.1 Διαδικασία απομόνωσης - καθαρισμού των κοκκωδών κυττάρων

1. Το ωοθυλακικό υγρό των γυναικών που είχε συλλεχθεί, κατανέμεται ανά 6ml σε πλαστικά σωληνάρια χωρητικότητας 15ml και αραιώνεται με φωσφορικό αλατούχο ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffered Saline ή PBS, Thermo Scientific) σε αναλογία 3 προς 1. Το PBS έχει την ικανότητα να συμπαρασύρει και να απομακρύνει τα ερυθρά αιμοσφαίρια καθώς και τους υπόλοιπους ανεπιθύμητους παράγοντες του ωοθυλακικού υγρού.
2. Το μίγμα αναδεύεται και αφήνεται σε ηρεμία, προκειμένου να καθιζάνουν τα κοκκώδη κύτταρα και να δημιουργηθεί ίζημα κυττάρων.
3. Ακολουθεί απομάκρυνση του υπερκειμένου, στο οποίο υπάρχουν τα ερυθρά αιμοσφαίρια και οι διάφορες προσμίξεις του ωοθυλακικού υγρού. Το ίζημα που απομένει επαναδιαλύεται σε PBS και συγχρόνως γίνεται χειροκίνητος καθαρισμός του διαλύματος. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 5 φορές και ολοκληρώνεται με φυγοκέντρηση για 10λεπτά στις 800στροφές/λεπτό.
4. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε θρεπτικό μέσο 199 (Biochrom AG), το οποίο περιέχει 10% FBS (Fetal Bovine Serum ή FBS, Biochrom AG) 2% γλουταμίνη (Sigma USA) και 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη Sigma USA).
5. Τέλος, γίνεται η μέτρηση των κοκκωδών κυττάρων και η εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους.

2.2.2 Καταμέτρηση και βιωσιμότητα κοκκωδών κυττάρων

1. Ισοποσότητες του κυτταρικού εναιωρήματος και χρωστικής μπλε του τρυπανίου (trypan blue, Gibco Intrivogen) χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση των κυττάρων. Το μπλε του τρυπανίου διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και χρωματίζει μπλε τα κύτταρα. Η μέτρηση των κυττάρων πραγματοποιείται με τη χρήση πλάκας Neubauer και μικροσκοπίου αντίθετης φάσης.
2. Τα κοκκώδη κύτταρα καταμετρούνται στα τέσσερα χαρακτηριστικά πεδία της πλάκας Neubauer και υπολογίζεται ο μέσος όρος των κυττάρων καθώς και η βιωσιμότητά τους ως εξής:

Πεδίο	A	B	Γ	Δ	Μέσος όρος
Αρ. ζώντων κυττάρων	α	β	γ	δ	$Z = \frac{\alpha + \beta + \gamma + \delta}{4}$
Αρ. νεκρών κυττάρων	ε	ζ	η	θ	$N = \frac{\varepsilon + \zeta + \eta + \theta}{4}$
Συνολικός αριθμός κυττάρων	$\Sigma = \alpha + \beta + \gamma + \delta + \varepsilon + \zeta + \eta + \theta$				

Αριθμός κυττάρων/ml:

Μέσος όρος ζώντων κυττάρων(Z) x συνολικό όγκο (ml) των κυττάρων στο σωλήνα x αραίωση (=2) x 10^4

Αριθμός κυττάρων στο δείγμα:

Κύτταρα/ml x αρχικό όγκο ελαιωρήματος των κυττάρων στο σωλήνα

Βιωσιμότητα των κοκκωδών κυττάρων (%):

$$\frac{\text{Μέσος όρος ζώντων κυττάρων (Z)}}{\text{Συνολικό αριθμό των κυττάρων (\Sigma)}} \times 100$$

Πίνακας 1: Καταμέτρηση και Βιωσιμότητα των κοκκωδών κυττάρων

- Τα κύτταρα διαμοιράζονται σε τρυβλία πλάκας 24θέσεων. Η συγκέντρωση των κυττάρων ανά τρυβλίο είναι 75000/ml. Οι καλλιέργειες επωάζονται σε συνθήκες 37°C και 5% CO₂.

2.2.3 Προσδιορισμός συγκέντρωσης της BMP-2 και του GDF-9 για την καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων:

Για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης της BMP-2 και του GDF-9 σε σχέση με την παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης έγιναν δοκιμές των παρακάτω συγκεντρώσεων σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων για 48 ώρες.

BMP-2	GDF-9
Control	Control
0.5ng/ml	0.1ng/ml
5ng/ml	1ng/ml
50ng/ml	10ng/ml
100ng/ml	50ng/ml
500ng/ml	100ng/ml

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις της BMP και του GDF-9

Η στατιστική μελέτη που έγινε από τα αποτελέσματα της ραδιοανοσοδοκιμασίας δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την βέλτιστη συγκέντρωση της BMP-2 και του GDF-9 για την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης και προγεστερόνης. Για αυτό το λόγο κινηθήκαμε βιβλιογραφικά και χρησιμοποιήσαμε 50ng/ml για την BMP-2 και 100ng/ml για το GDF-9.

2.2.4 Καλλιέργεια των κοκκωδών κυττάρων με BMP-2 και GDF-9:

1. Οι καλλιέργειες υποβάλλονται σε προ-επώαση 48 ωρών στον κλίβανο, με θρεπτικό μέσο που περιέχει ορό ώστε να προωθηθεί η επικόλληση και η ανάπτυξη των κυττάρων στην επιφάνεια καλλιέργειας.

Με το τέλος της προ-επώασης, το θρεπτικό μέσο αντικαθίσταται με φρέσκο μέσο καλλιέργειας ελεύθερο ορού στο οποίο προστίθεται ανδροστενδιόνη (A4) σε συγκέντρωση 0.1M (A₄, Sigma USA), ως υπόστρωμα αρωματοποίησης.

2. Οι καλλιέργειες διαχωρίστηκαν στις εξής παρακάτω ομάδες :

Συνδιασμοί ορμονών στις καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων 48 ωρών
1) Control (Ομάδα ελέγχου A4)
2) BMP-2 (50ng/ml)
3) GDF-9 (100ng/ml)
4) BMP-2 (50ng/ml) + GDF-9 (100ng/ml)
5) BMP-2 (50ng/ml) + FSH (10ng/ml)
6) BMP-2 (50ng/ml) + FSH (10ng/ml) + GDF-9 (100ng/ml)
7) GDF-9 (100ng/ml) + FSH (10ng/ml)
8) FSH (10ng/ml)

Πίνακας 3: Ομάδες καλλιέργειας

3. Οι καλλιέργειες τοποθετούνται στον κλίβανο για επώαση για 48 ώρες.
4. Με το πέρας του χρονικού διαστήματος της καλλιέργειας γίνεται η συλλογή του υπερκειμένου και αποθήκευση στους -80°C μέχρι την πραγματοποίηση των μετρήσεων της 17β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης.
5. Η μέθοδος για την μέτρηση των ορμονών που ακολουθήθηκε ήταν η ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA).

3. Αποτελέσματα

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των συγκεντρώσεων της BMP-2 και του GDF-9 σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων διαστήματος 48 ωρών χρησιμοποιήθηκε αρχικά το t-test για δύο ανεξάρτητες μεταβλητές όπου έγινε σύγκριση της παραγωγής της 17-β οιστραδιόλης και της προγεστερόνης για την BMP-2 και για τον GDF-9 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (control). Στη συνέχεια έγινε η ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA) όπου συγκρίθηκαν μεταξύ τους όλες οι συγκεντρώσεις για την BMP-2 και για τον GDF-9 για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσής τους όσον αφορά την μέγιστη έκκριση της 17β- οιστραδιόλης και της προγεστερόνης σε διάστημα 48 ωρών. Η στατιστική μελέτη δεν έδειξε ιδιαίτερα στατιστικά σημαντική διαφορά στις διάφορες συγκεντρώσεις της BMP-2 και του GDF-9 και γι'αυτό το λόγο επιλέξαμε για την συνέχεια του πειράματος την συγκέντρωση για την BMP-2 50ng/ml και για τον GDF-9 100ng/ml οι οποίες αναφέρονται βιβλιογραφικά ότι είναι σημαντικές. Τέλος, πραγματοποιήθηκε στατιστική μελέτη με την ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA), για την παραγωγή της 17-β οιστραδιόλης και προγεστερόνης σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων διαστήματος 48 ωρών, στους εξής συνδυασμούς: Ομάδα ελέγχου (Control), BMP-2, GDF-9, BMP-2+GDF-9, BMP-2+FSH, BMP-2+GDF-9+FSH, GDF-9+FSH, FSH. Το στατιστικό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το SPSS 17.0.

A) Τα αποτελέσματα που πήραμε μετά την ραδιοανοσοδοκιμασία (RIA) για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης BMP-2 και του GDF-9 για την μέγιστη παραγωγή 17-β οιστραδιόλης και προγεστερόνης ήταν τα παρακάτω:

Group		Οιστραδιόλη (E2)	Προγεστερόνη (P4)
Control		1746	96
		1056	100
		1691	240
BMP-2	0.5ng/ml	2200	60
		1030	100
		1597	182

BMP-2	5ng/ml	2147	510
		1435	140
		1627	164
BMP-2	50ng/ml	2190	506
		1100	80
		1595	150
BMP-2	100ng/ml	2564	428
		1142	520
		1605	148
BMP-2	500ng/ml	2021	540
		764	76
		1573	128
GDF-9	0.1ng/ml	2429	512
		1450	142
		1708	344
GDF-9	1ng/ml	2349	450
		1987	190
		1699	228
GDF-9	10ng/ml	2661	504
		2051	150
		702	54
GDF-9	50ng/ml	2247	446
		2073	258
		1702	224
GDF-9	100ng/ml	2454	554
		1268	90
		1718	252

Πίνακας 4: Αποτελέσματα της RIA για τον προσδιορισμό συγκεντρώσεων BMP-2, GDF-9

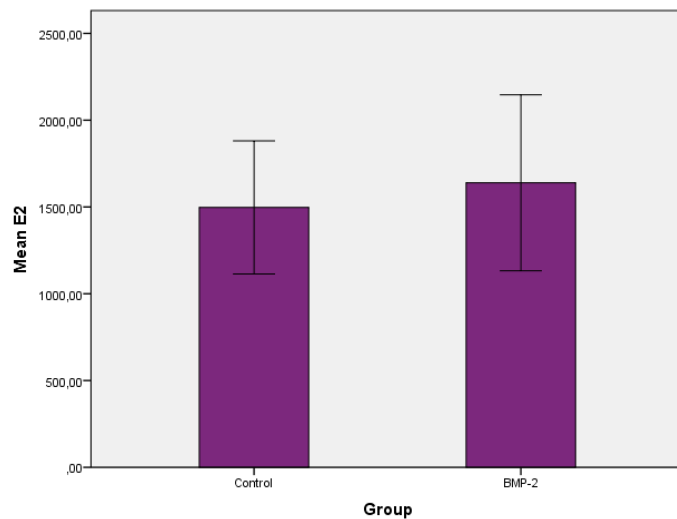
t-test για δύο ανεξάρτητες μεταβλητές

BMP-2

- Για την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης

Group Statistics					
Group		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
E2	Control	3	1497.6667	383.48186	221.40335
	BMP2	15	1639.3333	507.29967	130.98421

Πίνακας 5: Επίδραση της BMP-2 για την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης

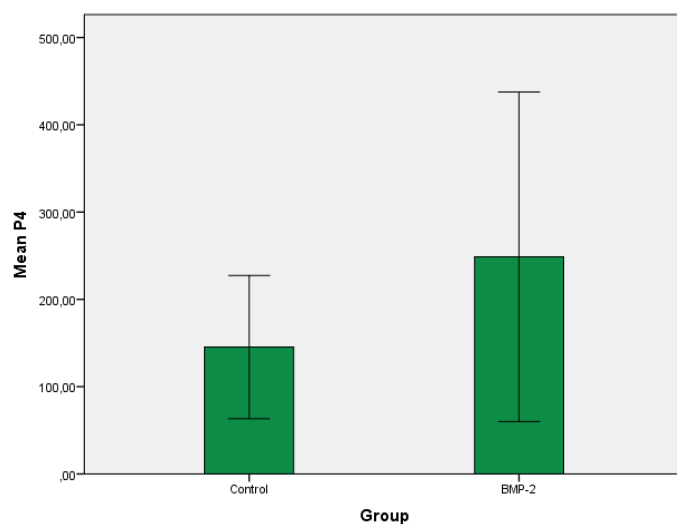


Γράφημα 1: Απεικόνιση της παραγωγής 17-β οιστραδιόλης από την BMP-2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

- Για την παραγωγή προγεστερόνης

Group Statistics					
	Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
P4	Control	3	145.3333	82.00813	47.34742
	BMP2	15	248.8000	188.78983	48.74532

Πίνακας 6: Επίδραση της BMP-2 για την παραγωγή προγεστερόνης



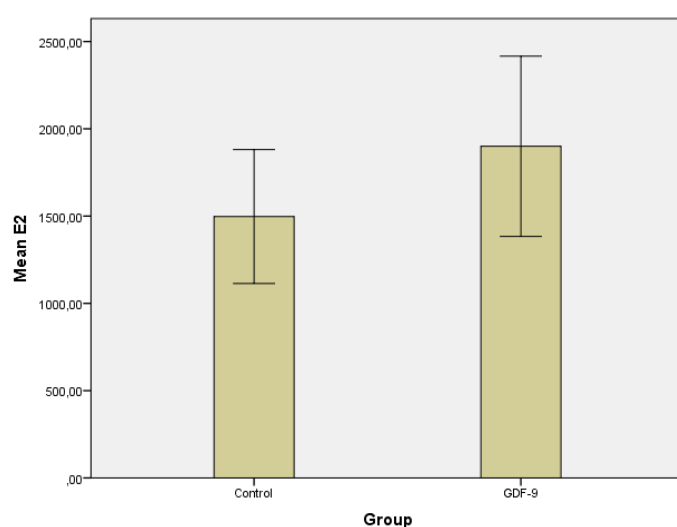
Γράφημα 2: Απεικόνιση της παραγωγής της προγεστερόνης από την BMP-2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

GDF-9

- Για την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης

Group Statistics					
Group		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
E2	Control	3	1497.6667	383.48186	221.40335
	GDF9	15	1899.8667	516.50665	133.36144

Πίνακας 7: Επίδραση του GDF-9 για την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης

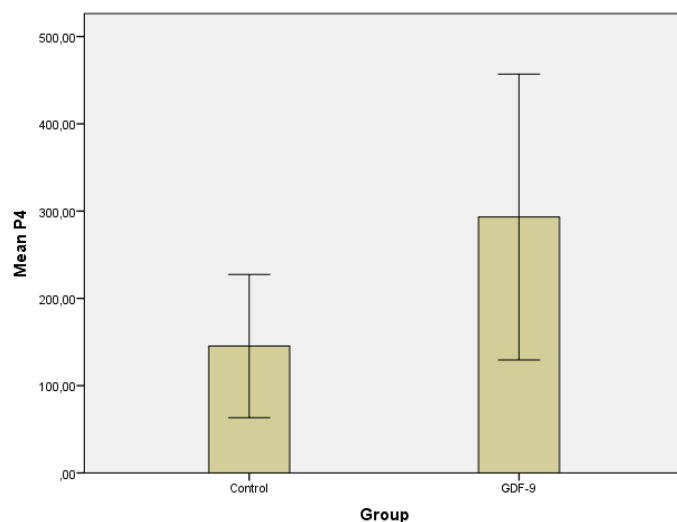


Γράφημα 3: Απεικόνιση της παραγωγής 17-β οιστραδιόλης από τον GDF-9 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

- Για την παραγωγή προγεστερόνης

Group Statistics					
Group		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
P4	Control	3	145.3333	82.00813	47.34742
	GDF9	15	293.2000	163.73812	42.27700

Πίνακας 8: Επίδραση του GDF-9 για την παραγωγή προγεστερόνης



Γράφημα 4: Απεικόνιση της παραγωγής της προγεστερόνης από τον GDF-9 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Η στατιστική ανάλυση με t-test για δύο ανεξάρτητες μεταβλητές ανάμεσα στην BMP-2 και την ομάδα ελέγχου για την παραγωγή της 17-β οιστραδιόλης και της προγεστερόνης έδειξε ότι : α) η BMP-2 προκαλεί σχετικά μικρή αύξηση της 17-β οιστραδιόλης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 1) ενώ παρατηρείται σημαντική αύξηση της προγεστερόνης από την BMP-2 σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (Γράφημα 2).

Για τον GDF-9 η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι ο GDF-9 προκαλεί σημαντική αύξηση της παραγωγής τόσο της 17-β οιστραδιόλης (Γράφημα 3) όσο και της προγεστερόνης (Γράφημα 4) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση διασποράς (one-way Anova) για την σύγκριση των συγκεντρώσεων της BMP-2 (0.5 ng/ml, 5 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml) και του GDF-9 (0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) για την εύρεση της μέγιστης παραγωγής της 17-β οιστραδιόλης και της προγεστερόνης.

Ανάλυση διασποράς (one-way ANOVA)

BMP-2

- Σύγκριση των συγκεντρώσεων της BMP-2 σε σχέση με την παραγωγή της 17-β οιστραδιόλης.

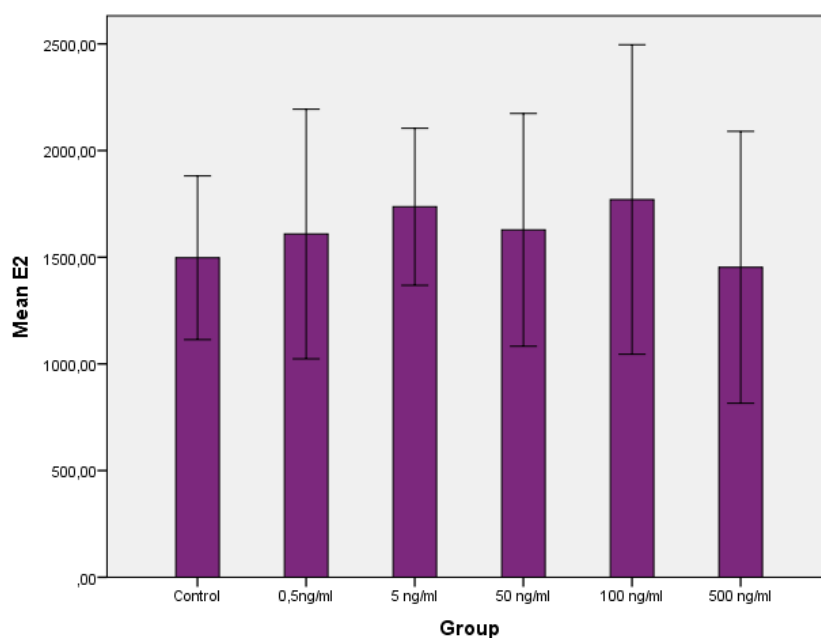
E2	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	3	1497,6667	383,48186	221,40335	545,0449	2450,2884
0,5ng/ml	3	1609,0000	585,09230	337,80320	155,5502	3062,4498
5 ng/ml	3	1736,3333	368,37662	212,68234	821,2351	2651,4316
50 ng/ml	3	1628,3333	545,76399	315,09699	272,5804	2984,0862
100 ng/ml	3	1770,3333	725,27397	418,73712	-31,3471	3572,0138
500 ng/ml	3	1452,6667	637,08110	367,81895	-129,9305	3035,2639
Total	18	1615,7222	481,86107	113,57574	1376,0983	1855,3461

Πίνακας 9: Επίδραση των συγκεντρώσεων της BMP-2 για την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης

Bonferoni

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	0,5ng/ml	-111,33333	453,97573	1,000	-1767,8405	1545,1738
	5 ng/ml	-238,66667	453,97573	1,000	-1895,1738	1417,8405
	50 ng/ml	-130,66667	453,97573	1,000	-1787,1738	1525,8405
	100 ng/ml	-272,66667	453,97573	1,000	-1929,1738	1383,8405
	500 ng/ml	45,00000	453,97573	1,000	-1611,5072	1701,5072
0,5ng/ml	Control	111,33333	453,97573	1,000	-1545,1738	1767,8405
	5 ng/ml	-127,33333	453,97573	1,000	-1783,8405	1529,1738
	50 ng/ml	-19,33333	453,97573	1,000	-1675,8405	1637,1738
	100 ng/ml	-161,33333	453,97573	1,000	-1817,8405	1495,1738
	500 ng/ml	156,33333	453,97573	1,000	-1500,1738	1812,8405
5 ng/ml	Control	238,66667	453,97573	1,000	-1417,8405	1895,1738
	0,5ng/ml	127,33333	453,97573	1,000	-1529,1738	1783,8405
	50 ng/ml	108,00000	453,97573	1,000	-1548,5072	1764,5072
	100 ng/ml	-34,00000	453,97573	1,000	-1690,5072	1622,5072
	500 ng/ml	283,66667	453,97573	1,000	-1372,8405	1940,1738
50 ng/ml	Control	130,66667	453,97573	1,000	-1525,8405	1787,1738
	0,5ng/ml	19,33333	453,97573	1,000	-1637,1738	1675,8405
	5 ng/ml	-108,00000	453,97573	1,000	-1764,5072	1548,5072
	100 ng/ml	-142,00000	453,97573	1,000	-1798,5072	1514,5072
	500 ng/ml	175,66667	453,97573	1,000	-1480,8405	1832,1738

100 ng/ml	Control	272,66667	453,97573	1,000	-1383,8405	1929,1738
	0,5ng/ml	161,33333	453,97573	1,000	-1495,1738	1817,8405
	5 ng/ml	34,00000	453,97573	1,000	-1622,5072	1690,5072
	50 ng/ml	142,00000	453,97573	1,000	-1514,5072	1798,5072
	500 ng/ml	317,66667	453,97573	1,000	-1338,8405	1974,1738
500 ng/ml	Control	-45,00000	453,97573	1,000	-1701,5072	1611,5072
	0,5ng/ml	-156,33333	453,97573	1,000	-1812,8405	1500,1738
	5 ng/ml	-283,66667	453,97573	1,000	-1940,1738	1372,8405
	50 ng/ml	-175,66667	453,97573	1,000	-1832,1738	1480,8405
	100 ng/ml	-317,66667	453,97573	1,000	-1974,1738	1338,8405



Γράφημα 5: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων της BMP-2 για την παραγωγή της 17-β οιστραδιόλης.

- Σύγκριση των συγκεντρώσεων της BMP-2 σε σχέση με την παραγωγή της προγεστερόνης.

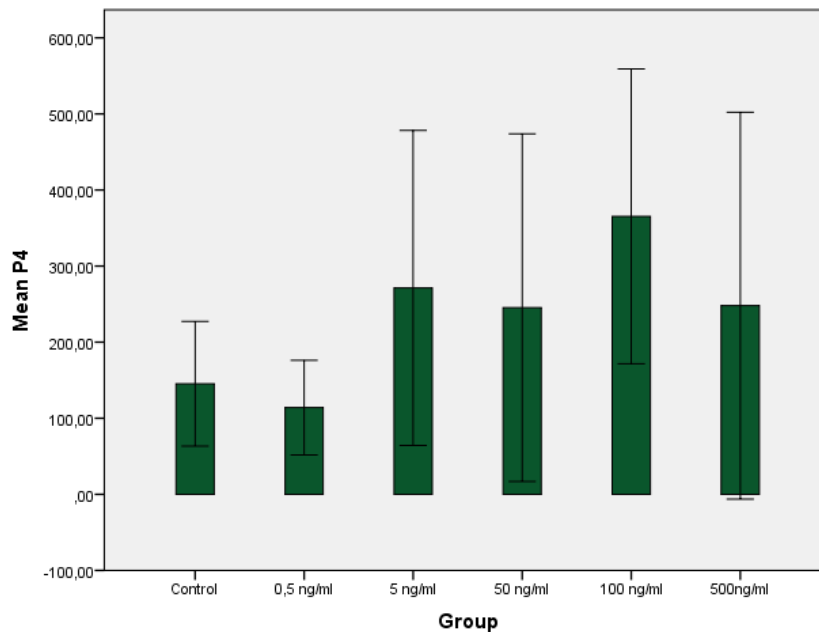
Descriptives

P4	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	3	145,3333	82,00813	47,34742	-58,3862	349,0528
0,5 ng/ml	3	114,0000	62,19325	35,90729	-40,4966	268,4966
5 ng/ml	3	271,3333	207,03945	119,53428	-242,9812	785,6478
50 ng/ml	3	245,3333	228,44109	131,89053	-322,1458	812,8125
100 ng/ml	3	365,3333	193,75586	111,86500	-115,9829	846,6496
500ng/ml	3	248,0000	254,21251	146,76966	-383,4989	879,4989
Total	18	231,5556	178,09390	41,97714	142,9915	320,1196

Πίνακας 10: Επίδραση των συγκεντρώσεων της BMP-2 για την παραγωγή προγεστερόνης.

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	0,5 ng/ml	31,33333	151,95370	1,000	-523,1289	585,7955
	5 ng/ml	-126,00000	151,95370	1,000	-680,4622	428,4622
	50 ng/ml	-100,00000	151,95370	1,000	-654,4622	454,4622
	100 ng/ml	-220,00000	151,95370	1,000	-774,4622	334,4622
	500ng/ml	-102,66667	151,95370	1,000	-657,1289	451,7955
0,5 ng/ml	Control	-31,33333	151,95370	1,000	-585,7955	523,1289
	5 ng/ml	-157,33333	151,95370	1,000	-711,7955	397,1289
	50 ng/ml	-131,33333	151,95370	1,000	-685,7955	423,1289
	100 ng/ml	-251,33333	151,95370	1,000	-805,7955	303,1289
	500ng/ml	-134,00000	151,95370	1,000	-688,4622	420,4622
5 ng/ml	Control	126,00000	151,95370	1,000	-428,4622	680,4622
	0,5 ng/ml	157,33333	151,95370	1,000	-397,1289	711,7955
	50 ng/ml	26,00000	151,95370	1,000	-528,4622	580,4622
	100 ng/ml	-94,00000	151,95370	1,000	-648,4622	460,4622
	500ng/ml	23,33333	151,95370	1,000	-531,1289	577,7955
50 ng/ml	Control	100,00000	151,95370	1,000	-454,4622	654,4622
	0,5 ng/ml	131,33333	151,95370	1,000	-423,1289	685,7955
	5 ng/ml	-26,00000	151,95370	1,000	-580,4622	528,4622
	100 ng/ml	-120,00000	151,95370	1,000	-674,4622	434,4622
	500ng/ml	-2,66667	151,95370	1,000	-557,1289	551,7955
100 ng/ml	Control	220,00000	151,95370	1,000	-334,4622	774,4622
	0,5 ng/ml	251,33333	151,95370	1,000	-303,1289	805,7955
	5 ng/ml	94,00000	151,95370	1,000	-460,4622	648,4622
	50 ng/ml	120,00000	151,95370	1,000	-434,4622	674,4622
	500ng/ml	117,33333	151,95370	1,000	-437,1289	671,7955
500ng/ml	Control	102,66667	151,95370	1,000	-451,7955	657,1289

0,5 ng/ml	134,00000	151,95370	1,000	-420,4622	688,4622
5 ng/ml	-23,33333	151,95370	1,000	-577,7955	531,1289
50 ng/ml	2,66667	151,95370	1,000	-551,7955	557,1289
100 ng/ml	-117,33333	151,95370	1,000	-671,7955	437,1289



Γράφημα 6: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων της BMP-2 για την παραγωγή προγεστερόνης

GDF-9

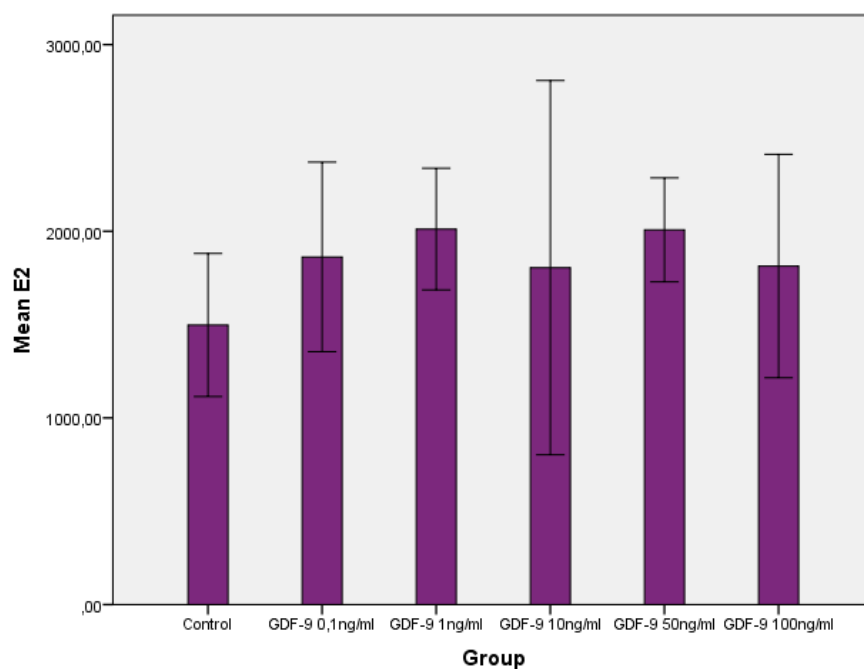
- Σύγκριση των συγκεντρώσεων σε σχέση με την παραγωγή της 17-β οιστραδιόλης.

E2	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Control	3	1497,6667	383,48186	221,40335
GDF-9 0,1ng/ml	3	1862,3333	507,41929	292,95866
GDF-9 1ng/ml	3	2011,6667	325,70129	188,04373
GDF-9 10ng/ml	3	1804,6667	1002,46214	578,77178
GDF-9 50ng/ml	3	2007,3333	278,37086	160,71749
GDF-9 100ng/ml	3	1813,3333	598,71975	345,67101
Total	18	1832,8333	510,67640	120,36758

Πίνακας 11: Επίδραση των συγκεντρώσεων του GDF-9 για την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης

Bonferoni

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	GDF-9 0,1ng/ml	-364,66667	465,65366	1,000
	GDF-9 1ng/ml	-514,00000	465,65366	1,000
	GDF-9 10ng/ml	-307,00000	465,65366	1,000
	GDF-9 50ng/ml	-509,66667	465,65366	1,000
	GDF-9 100ng/ml	-315,66667	465,65366	1,000
GDF-9 0,1ng/ml	Control	364,66667	465,65366	1,000
	GDF-9 1ng/ml	-149,33333	465,65366	1,000
	GDF-9 10ng/ml	57,66667	465,65366	1,000
	GDF-9 50ng/ml	-145,00000	465,65366	1,000
	GDF-9 100ng/ml	49,00000	465,65366	1,000
GDF-9 1ng/ml	Control	514,00000	465,65366	1,000
	GDF-9 0,1ng/ml	149,33333	465,65366	1,000
	GDF-9 10ng/ml	207,00000	465,65366	1,000
	GDF-9 50ng/ml	4,33333	465,65366	1,000
	GDF-9 100ng/ml	198,33333	465,65366	1,000
GDF-9 10ng/ml	Control	307,00000	465,65366	1,000
	GDF-9 0,1ng/ml	-57,66667	465,65366	1,000
	GDF-9 1ng/ml	-207,00000	465,65366	1,000
	GDF-9 50ng/ml	-202,66667	465,65366	1,000
	GDF-9 100ng/ml	-8,66667	465,65366	1,000
GDF-9 50ng/ml	Control	509,66667	465,65366	1,000
	GDF-9 0,1ng/ml	145,00000	465,65366	1,000
	GDF-9 1ng/ml	-4,33333	465,65366	1,000
	GDF-9 10ng/ml	202,66667	465,65366	1,000
	GDF-9 100ng/ml	194,00000	465,65366	1,000
GDF-9 100ng/ml	Control	315,66667	465,65366	1,000
	GDF-9 0,1ng/ml	-49,00000	465,65366	1,000
	GDF-9 1ng/ml	-198,33333	465,65366	1,000
	GDF-9 10ng/ml	8,66667	465,65366	1,000
	GDF-9 50ng/ml	-194,00000	465,65366	1,000



Γράφημα 7: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων του GDF-9 για την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης.

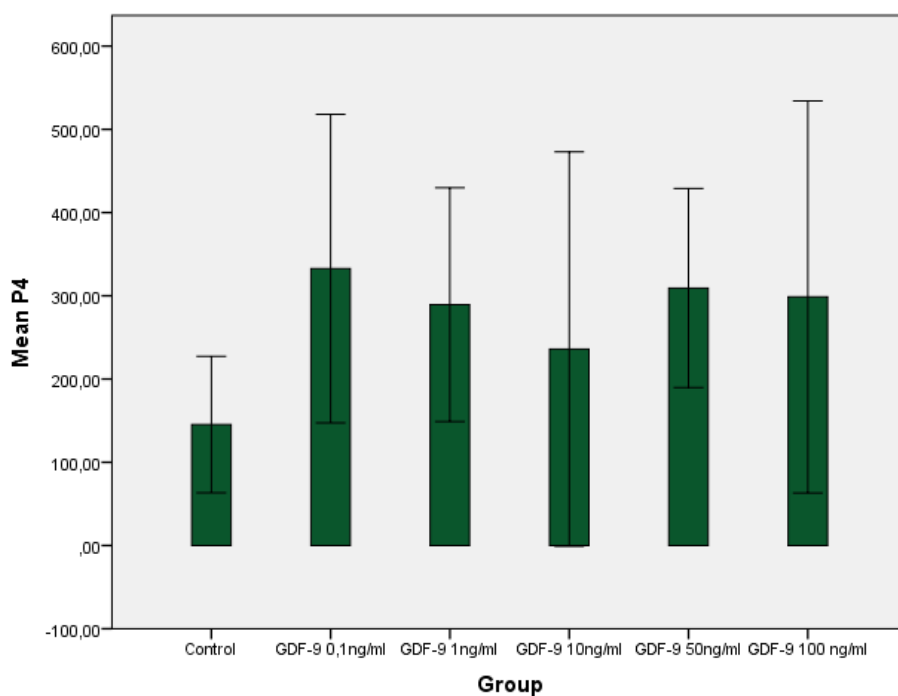
- Σύγκριση των συγκεντρώσεων σε σχέση με την παραγωγή της προγεστερόνης.

Descriptives				
P4	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
Control	3	145,3333	82,00813	47,34742
GDF-9 0,1ng/ml	3	332,6667	185,26018	106,96001
GDF-9 1ng/ml	3	289,3333	140,43266	81,07884
GDF-9 10ng/ml	3	236,0000	237,00633	136,83567
GDF-9 50ng/ml	3	309,3333	119,57146	69,03461
GDF-9 100 ng/ml	3	298,6667	235,49381	135,96241
Total	18	268,5556	161,51023	38,06833

Πίνακας 12: Επίδραση των συγκεντρώσεων του GDF-9 για την παραγωγή προγεστερόνης

Bonferoni

(I) Group	(J) Group	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Control	GDF-9 0,1ng/ml	-187,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 1ng/ml	-144,00000	144,02726	1,000
	GDF-9 10ng/ml	-90,66667	144,02726	1,000
	GDF-9 50ng/ml	-164,00000	144,02726	1,000
	GDF-9 100 ng/ml	-153,33333	144,02726	1,000
GDF-9 0,1ng/ml	Control	187,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 1ng/ml	43,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 10ng/ml	96,66667	144,02726	1,000
	GDF-9 50ng/ml	23,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 100 ng/ml	34,00000	144,02726	1,000
GDF-9 1ng/ml	Control	144,00000	144,02726	1,000
	GDF-9 0,1ng/ml	-43,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 10ng/ml	53,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 50ng/ml	-20,00000	144,02726	1,000
	GDF-9 100 ng/ml	-9,33333	144,02726	1,000
GDF-9 10ng/ml	Control	90,66667	144,02726	1,000
	GDF-9 0,1ng/ml	-96,66667	144,02726	1,000
	GDF-9 1ng/ml	-53,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 50ng/ml	-73,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 100 ng/ml	-62,66667	144,02726	1,000
GDF-9 50ng/ml	Control	164,00000	144,02726	1,000
	GDF-9 0,1ng/ml	-23,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 1ng/ml	20,00000	144,02726	1,000
	GDF-9 10ng/ml	73,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 100 ng/ml	10,66667	144,02726	1,000
GDF-9 100 ng/ml	Control	153,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 0,1ng/ml	-34,00000	144,02726	1,000
	GDF-9 1ng/ml	9,33333	144,02726	1,000
	GDF-9 10ng/ml	62,66667	144,02726	1,000
	GDF-9 50ng/ml	-10,66667	144,02726	1,000



Γράφημα 8: Απεικόνιση των συγκεντρώσεων του GDF-9 για την παραγωγή προγεστερόνης.

Από την ανάλυση διασποράς (one-way Anova) για την εύρεση της συγκέντρωσης της βέλτιστης παραγωγής της 17-β οιστραδιόλης (για την BMP-2, γράφημα 5 και για τον GDF-9, γράφημα 7) και προγεστερόνης (για την BMP-2, γράφημα 6 και για τον GDF-9, γράφημα 8) των παραγόντων BMP-2 και GDF-9 δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ίσως εξαιτίας των λίγων δειγμάτων.

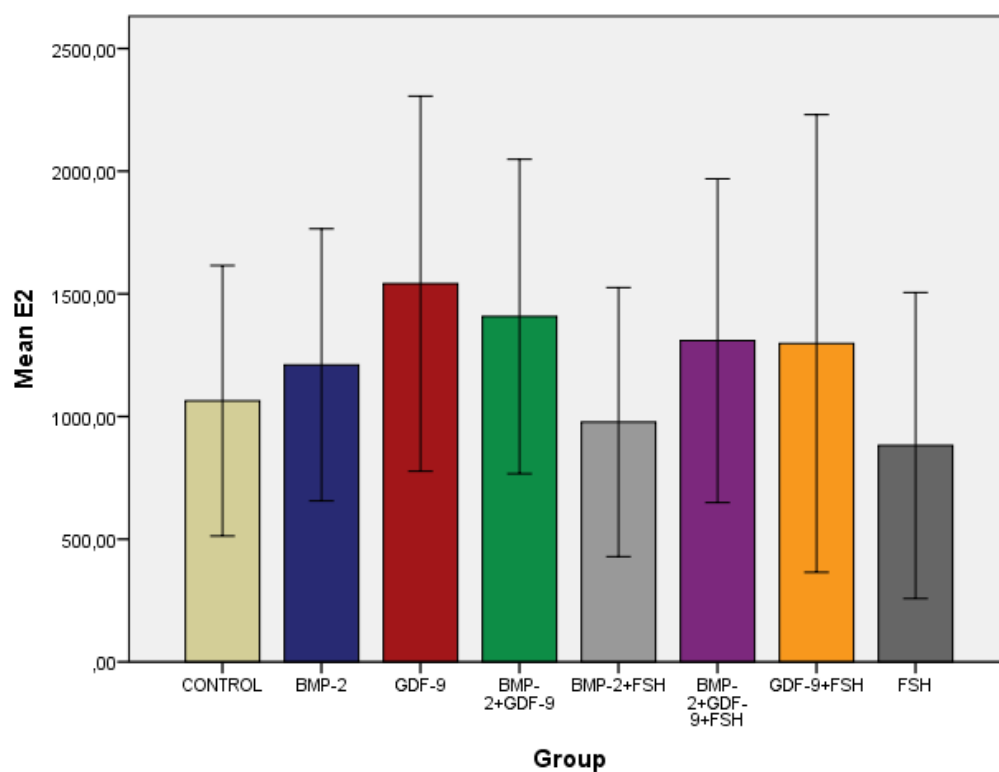
Γ) Αποτελέσματα μετρήσεων των συνδυασμών ορμονών των κοκκωδών κυττάρων

GROUP	ESTRADIOL (E2)	PROGESTERONE (P4)
CONTROL	1593	214
	493	84
	1106	160
BMP-2	1721	272
	620	68
	1290	178
GDF-9	2295	306
	766	136
	1563	220
BMP-2 & GDF-9	1976	222
	713	92
	1534	210
BMP-2 & FSH	1432	216
	368	54
	1131	180
BMP-2 & GDF-9 & FSH	1807	240
	561	72
	1559	198
GDF-9 & FSH	2375	322
	760	138
	758	98
FSH	1602	236
	514	74
	530	74

Πίνακας 13: Αποτελέσματα μετρήσεων των συνδυασμών ορμονών των κοκκωδών κυττάρων με την μέθοδο RIA.

- Για την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης

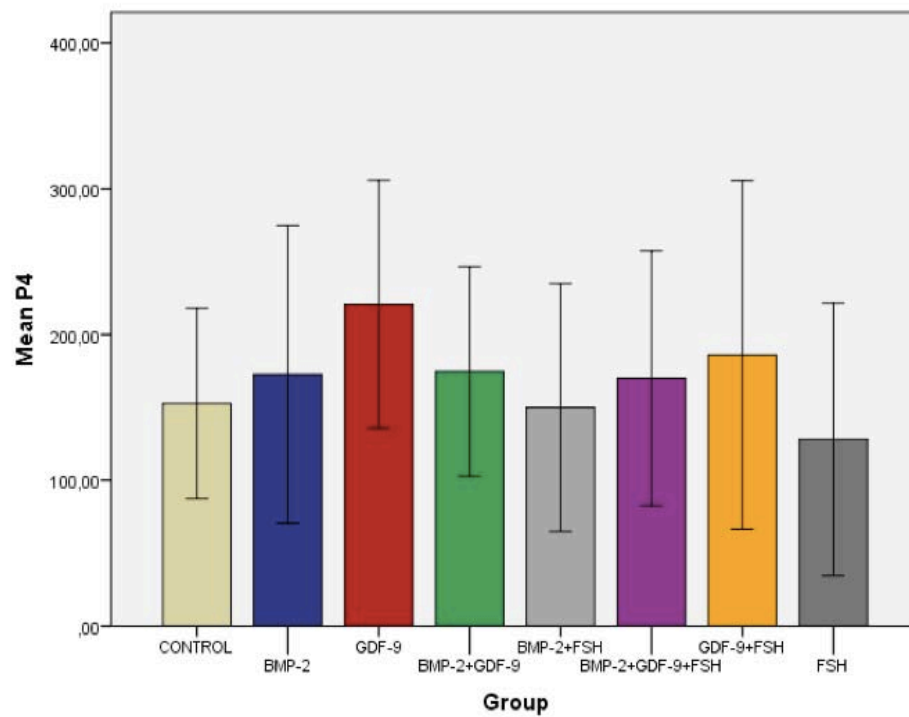
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
E2				
CONTROL	3	1064,0000	551,20142	318,23629
BMP-2	3	1210,3333	554,80657	320,31772
GDF-9	3	1541,3333	764,73024	441,51721
BMP-2+GDF-9	3	1407,6667	640,90743	370,02808
BMP-2+FSH	3	977,0000	548,46240	316,65491
BMP-2+GDF-9+FSH	3	1309,0000	659,54833	380,79041
GDF-9+FSH	3	1297,6667	932,99857	538,66698
FSH	3	882,0000	623,58961	360,02963
Total	24	1211,1250	599,03200	122,27689



Γράφημα 9: Απεικόνιση της παραγωγής της E2 στους συνδυασμούς

- Για την παραγωγή προγεστερόνης

P4	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error
CONTROL	3	152,6667	65,30952	37,70647
BMP-2	3	172,6667	102,10452	58,95007
GDF-9	3	220,6667	85,00196	49,07590
BMP-2+GDF-9	3	174,6667	71,84242	41,47824
BMP-2+FSH	3	150,0000	85,06468	49,11212
BMP-2+GDF-9+FSH	3	170,0000	87,42997	50,47772
GDF-9+FSH	3	186,0000	119,46548	68,97342
FSH	3	128,0000	93,53074	54,00000
Total	24	169,3333	79,64414	16,25729



Γράφημα 9: Απεικόνιση της παραγωγής της P4 στους συνδυασμούς

4. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, προσδιορίζουν την δράση του συνδυασμού της BMP-2 και του GDF-9 στη στεροειδογένεση των ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων. Καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων επώαστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις της BMP-2 και του GDF-9 για 48 ώρες ώστε να προσδιοριστεί η βέλτιστη συγκέντρωση για την παραγωγή 17β-οιστραδιόλης και προγεστερόνης. Η στατιστική μελέτη που έγινε δεν έδειξε σημαντικές μεταβολές στην παραγωγή 17β-οιστραδιόλης και προγεστερόνης, για αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκαν για την BMP-2 50ng/ml και για το GDF-9 100ng/ml που σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές (Haugen *et al.*, 2010; Vitt *et al.*, 2000). Εφόσον προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση της BMP-2 και του GDF-9 ακολούθησε καλλιέργεια κοκκωδών κυττάρων για 48 ώρες, με τους ακόλουθους συνδυασμούς ορμονών: BMP-2, GDF-9, BMP-2+GDF-9, BMP-2+FSH, BMP-2+GDF-9+FSH, GDF-9+FSH, FSH με σκοπό να προσδιοριστεί η επίδραση του συνδυασμού της BMP-2 και του GDF-9 στην παραγωγή των στεροειδών ορμονών.

Προγενέστερες μελέτες σε κοκκώδη κύτταρα προβάτων έδειξαν πως η BMP-2 προκαλεί αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης και διαφοροποίηση των κοκκωδών κυττάρων (Souza *et al.*, 2002). Σε μελέτες που έγιναν σε ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα βρέθηκε πως η BMP-2 αυξάνει την έκφραση των υποδοχέων της FSH και του mRNA της αρωματάσης. Το γεγονός αυτό αυξάνει τη μετατροπή της ανδροστενδιόνης σε οιστραδιόλη που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής της οιστραδιόλης (Shi *et al.*, 2011).

Αντίθετες ήταν οι επιδράσεις της BMP-2 στην παραγωγή της προγεστερόνης. Μελέτες που έγιναν σε κοκκώδη κύτταρα χοίρων και βοοειδών έδειξαν πως η BMP-2 προκαλούσε αναστολή της παραγωγής της προγεστερόνης (Brankin *et al.*, 2005). Η BMP-2 προκαλεί αναστολή της προγεστερόνης η οποία προκαλείται από την επαγόμενη FSH σε κοκκώδη κύτταρα ορνιθών (Haugen *et al.*, 2010).

Όσον αφορά τη δράση του GDF-9 στη λειτουργία των ωοθηκών έχει βρεθεί σε μελέτες που έγιναν σε κοκκώδη κύτταρα ποντικών ότι ο GDF-9 αυξάνει την παραγωγή της 17-β οιστραδιόλης και της προγεστερόνης (Vitt *et al.*, 2000). Όσον αφορά την δράση του συνδυασμού του GDF-9 στην FSH, έδειξαν ότι ο GDF-9 αναστέλλει α) την παραγωγή της προερχόμενης 17-β οιστραδιόλης από την FSH ((Vitt *et al.*, 2000) και β) την παραγωγή της προγεστερόνης (μελέτες σε ποντίκια και βοοειδή) (Vitt *et al.*, 2000; Spicer *et al.*, 2006).

Η παρούσα μελέτη, η οποία πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά σε καλλιέργειες ανθρώπινων κοκκωδών κυττάρων, έδειξε χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά ότι η BMP-2 τείνει να αυξήσει (κατά 14%) την παραγωγή της οιστραδιόλης σε καλλιέργειες κοκκωδών κυττάρων που επώαστηκαν για 48 ώρες. Το αποτέλεσμα αυτό είναι σύμφωνο με τις προηγούμενες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε πρόβατα (Souza *et al.*, 2002). Όσον αφορά στην προγεστερόνη παρατηρήθηκε πως η BMP-2 προκάλεσε αύξηση της παραγωγής της (κατά 13%), γεγονός το οποίο έρχεται σε αντίθεση με τις προηγούμενες μελέτες σε κοκκώδη κύτταρα χοίρων και βοοειδών (Brankin *et al.*, 2005).

Συγκρίνοντας τον συνδυασμό BMP-2+FSH ως προς την παραγωγή της οιστραδιόλης σε σχέση με την FSH παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της, γεγονός που συμφωνεί με τη μελέτη που έγινε στα ανθρώπινα κοκκώδη κύτταρα όπου έδειξε θετική δράση της BMP-2 στην έκφραση των υποδοχέων της FSH και κατά συνέπεια στην παραγωγή της οιστραδιόλης (Shi *et al.*, 2011).

Στην συνέχεια ελέγξαμε την δράση του GDF-9, ο οποίος φαίνεται να αυξάνει την παραγωγή της 17-β οιστραδιόλης (45%) και της προγεστερόνης (45%) και αυτό συμφωνεί με τις μελέτες που έγιναν σε κοκκώδη κύτταρα ποντικών (Vitt *et al.*, 2000). Επίσης η δράση του συνδυασμού του GDF-9 + FSH φαίνεται να δρα ανασταλτικά σε σχέση με τον GDF-9 στην παραγωγή της 17-β οιστραδιόλης και της προγεστερόνης και αυτό επιβεβαιώνεται από τις μελέτες που έγιναν σε κοκκώδη κύτταρα ποντικών και βοοειδών (Vitt *et al.*, 2000; Spicer *et al.*, 2006).

Όσον αφορά την επίδραση του συνδυασμού BMP-2 + GDF-9 φαίνεται να παράγει μία ενδιάμεση τιμή μεταξύ της BMP-2 και του GDF-9 στην παραγωγή οιστραδιόλης (αύξηση 32% σε σχέση με το control) και προγεστερόνης (αύξηση 14% σε σχέση με το control). Αυτό υποδηλώνει ότι υπάρχει κάποια σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Αντίστοιχες μελέτες δεν έχουν γίνει.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι η BMP-2 έχει την τάση να προκαλεί μείωση της δράση του GDF-9 τόσο για την παραγωγή 17-β οιστραδιόλης όσο και για την παραγωγή προγεστερόνης καθώς ο συνδυασμός αυτών (BMP-2+GDF-9) δημιουργεί ενδιάμεσες τιμές (μεταξύ της BMP-2 και του GDF-9) στην παραγωγή οιστραδιόλης και προγεστερόνης. Σαφή συμπεράσματα δεν μπορούν εξαχθούν διότι ο αριθμός των δειγμάτων ήταν μικρός. Γι' αυτό επιφυλασσόμαστε για περαιτέρω δοκιμές στο μέλλον σχετικά με τη δοσολογία των ορμονών καθώς και για τη χρησιμοποίηση περισσότερων δειγμάτων στις ομάδες μελέτης.

Συμπερασματικά, η BMP-2 και ο GDF-9 έχουν σημαντικό ρόλο στην στεροειδογένεση των ωοθηκών. Η BMP-2 είναι υπεύθυνη για την αύξηση των επιπέδων της οιστραδιόλης και παίζει ρόλο στην ρύθμιση της ωοθυλακιογένεσης, της ωοθυλακιόρριξης καθώς και της ωχρινοποίησης των ωοθυλακίων. Ο GDF-9 είναι υπεύθυνος για την αύξηση οιστραδιόλης και προγεστερόνης καθώς παίζει ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων. .

Βιβλιογραφία

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O (1999). Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2744–2750
- Aono A, Hazana M, Notoya K, Takitomi S, Yamasaki H, Tsukuda R, Sasaki S and Fujisawa Y (1995). Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun.* 210:670-677.
- Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL and Sawyer HR (1999) Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod* 60, 381–386.
- Brankin Victoria, Ruth L. Quinn, Robert Webb, Morag G. Hunter (2005). BMP-2 and BMP-6 modulate porcine theca cell function alone and co-cultured with granulosa cells. *Domestic Animal Endocrinology* 29,593-604.
- Carabatsos, J. Elvin, M.M. Matzuk, D.F. Albertini (1998). Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice, *Dev. Biol.* 204 373–384.
- Carson RS, Findlay J, Burger H & Trownson A (1979). Gonadotropin receptors of the ovine ovarian follicle during follicular growth and atresia. *Biology of Reproduction* 21 75–87. (doi:10.1095/biolreprod21.1.75)
- Christenson L & Strauss J III (2000). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta* 1529 175–187. (doi:10.1016/S1388- 1981(00)00147-5)
- Derynck R and Miyazono K (2008). TGF- β and the TGF- β family in the “ TGF- β family”. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York. 29-43

- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N and Matzuk M (1996). Growth differentiation factor- 9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*.383:531-535.
- Drummond AE (2006). The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol and Endocrinol*.4:16
- Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ and Matzuk MM (1998) The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol* 12, 1809–1817.
- Ducy P, Karsenty G (1999) The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney International*, Vol. 57 (2000), 2207–2214
- Duffy DM (2003) Growth differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle throughout the periovulatory interval. *Biol Reprod* 69, 725–732.
- Eckery DC, Whale LJ, Lawrence SB, Wylde KA, McNatty KP and Juengel JL (2002) Expression of mRNA encoding growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 during follicular formation and growth in a marsupial, the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Mol Cell Endocrinol* 192, 115–126.
- Elvin JA, Yan C, Wang P, Nishimori K, Matzuk MM (1999). Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor - 9 deficient ovary. *Mol Endocrinol*. 13:1018–1034.
- Eppig JJ, Wigglesworth K, Pendola FL (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *USA* 99:2890–2894
- Esch FS, Shimasaki S, Mercado M, Cooksey K, Ling N, Ying S, Veno N and Guillemin R (1987). Structural characterization of follistatin: a novel follicle-stimulating hormone release-inhibiting polypeptide from the gonad. *Mol Endocrinol*.1:849-855.

- Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schulz P, Heldin CH and Miyazono K (1993). Cloning of a TGF- β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- β type II receptor. *Cell*.75:681-692.
- Griffith DL, Keck PC, Sampath TK, Rueger DC and Carlson WD (1996). Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: structural paradigm for the transforming growth factor- β superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:878-883.
- Hanrahan JP, Gregan SM, Mulsant P, Mullen M, Davis GH, Powell R, Galloway SM (2004). Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biol Reprod* 70:900–909.
- Hanukoglu I (1992). Steroidogenic enzymes: structure, function and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J Steroid Biochem and Mol Biol*. 43:779-804.
- Haugen Morgan J and A L Johnson (2010). Bone morphogenetic protein 2 inhibits FSH responsiveness in hen granulosa cells. *Society for Reproduction and Fertility* 1470–1626.
- Heldin CH, Miyazono K and ten Dijke P (1997). TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature*. 390:465-471.
- Hillier SG, Wickings EJ, Illingworth PI, Yong EL, Reichert LE Jr, Baird DT and McNeilly AS (1991). Control of immunoactive inhibin production by human granulosa cells. *Clin Endocrinol*. 35:71-78.
- Hogan BL (1996). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & Development*. 10(13):1580-1594.
- Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJ, Hovatta O (2002). Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab* 87:316–321

- Israel DI, Nove J, Kerns KM, Moutsatsos IK and Kaufman RJ (1992). Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth factors*. 7:139-150.
- Jones WK, Richmond EA, White K, Sasak H, Kusmik W, Smart J, Oppermann H, Rueger DC and Tucker RF (1994). Osteogenic protein-1 (OP-1) expression and processing in Chinese hamster ovary cells: isolation of soluble complex containing the mature and pro-domains of OP-1. *Growth factors*. 11:215-225.
- Juengel JL, Bibby AH, Reader KL, Lun S, Quirke LD, Haydon LJ and McNatty KP (2004a) The role of transforming growth factor-b (TGF-b) during ovarian follicular development in sheep. *Reprod Biol Endocrinol* 2, 78–88.
- Juengel JL, Bodensteiner KJ, Heath DA, Hudson NL, Moeller CL, Smith P, Galloway SM, Davis GH, Sawyer HR and McNatty KP (2004b) Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. *Anim Reprod Sci* 82-83, 447–460.
- Juengel JL, Hudson NL, Whiting L and McNatty KP (2004c) Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. *Biol Reprod* 70, 557–561.
- Junqueira L. Carlos, Jose Carneiro (2005). *Basic Histology text & atlas*. McGraw Hill Lange.
- Kaivo-Oja N, Bondestam J, Kamarainen M, Koskimies J, Vitt U, Cranfield M, Vuojolainen K, Kallio JP, Olkkonen VM, Hayashi M, Moustakas A, Groome NP, ten Dijke P, Hsueh AJ, Ritvos O (2003). Growth differentiation factor-9 induces Smad2 activation and inhibin B production in cultured human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 88:755–762
- Kawabata M, Imamura T and Miyazono K (1998). Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth factor Rev*.9:49-61.
- Knight PG and Glister C (2006). TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction Reviews*. 132:191-206.

- Kusumato K, Bessho K, Fujimura K, Akioka J, Ogawa Y and Iizuka T (1997). Comparison of ectopic osteoinduction in vivo by recombinant human BMP-2 and recombinant *Xenopus* BMP-4/-7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun.* 239:575-579.
- Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, Heikinheimo M and Ritvos O (1998) A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev* 78, 135–140.
- Lin SY, Morrison JR, Phillips DJ and Kretser DM (2003). Regulation of ovarian function by the TGF- β superfamily and follistatin. *Reproduction.* 126:133-148.
- Liu F, Ventura F, Doody J and Massague J (1995). Human type II receptor for bone morphogenetic proteins (BMPs): extension of the two kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol.* 15:3479-3486.
- Macias D, Ganan Y, Sampath TK, Piedra Me, Ros MA and Hurle JM (1997). Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development.* 124:1109-1117.
- Massague J (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67:753-791.
- Massague J and Cen Y-C (2000). Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev.* 14:627-644.
- McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9:131–136
- McPherron AC and Lee SJ (1993) GDF-3 and GDF-9: two new members of the transforming growth factor- β superfamily containing a novel pattern of cysteines. *J Biol Chem* 268, 3444–3449.
- Merino R, Rodriguez-Leon J, Macias D, Ganan Y, Economides AN and Hurle JM (1999). The BMP antagonist Gremlin regulates outgrowth, chondrogenesis and programmed cell death in the developing limb. *Development.* 126:5515-5522.

- Messinis IE (2006). Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications. *Hum Reprod Upd.*12:557-571.
- Miller W (1988). Molecular Biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev.* 9:295-318.
- Miller WL and Auchus RJ (2011). The molecular biology, biochemistry and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 32(1):81-151.
- Miyazono K, Hellmann U, Wernstedt C and Heldin CH (1988). Latent high molecular weight complex of transforming growth factor β 1. *J Biol Chem.* 263:6407-6415.
- Newfeld, S. J., Padgett, R. W., Findley, S. D., Richter, B. G., Sanicola, M., de Cuevas, M. & Gelbart, W. M. (1997). Molecular evolution at the decapentaplegic locus in *Drosophila*. *Genetics*, 145, 297-309.
- Nohe A, Hassel S, Ehrich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI and Knaus P (2002). The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem.* 277:5330-5338.
- Orisaka Makoto, Sanae Orisaka, Jin-Yi Jiang, Jesse Craig, Yifang Wang, Fumikazu Kotsuji, and Benjamin K. Tsang (2010) Growth Differentiation Factor 9 Is Antiapoptotic during Follicular Development from Preantral to Early Antral Stage. *Molecular Endocrinology* 20(10):2456–2468
- Paradis Francois, Susan Novak, Gordon K Murdoch, Michael K Dyck, Walter T Dixon and George R Foxcroft (2010). Temporal regulation of BMP2, BMP6, BMP15, GDF9, BMPR1A, BMPR1B, BMPR2 and TGFBR1 mRNA expression in the oocyte, granulosa and theca cells of developing preovulatory follicles in the pig. *Society for Reproduction and Fertility* ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899.
- Penning T (1997). Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev.* 18:281-305.

- Piek Ester, Carl – Henrik Heldin, and Peter ten Dijke (1999) Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. Ludwig Institute for Cancer Research, Box 595, S-75124 Uppsala, Sweden.
- Prochazka R, Nemcova L, Nagyova E, Kanka J (2004). Expression of growth differentiation factor 9 messenger RNA in porcine growing and preovulatory ovarian follicles. *Biol Reprod.* 71:1290–1295.
- Reddi AH (1998). Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nature Biotechnology.* 16(3):247-252.
- Reddi AH (2005). BMPs: from bone morphogenetic proteins. *Cytokine & Growth factor Reviews.* 16(3):249-376.
- Ruppert, R., Hoffmann, E. & Sebald, W. (1996). Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin- binding site, which modifies its biological activity. *Eur. J. Biochem.* 237, 295-302.
- Schlunegger MP and Grutter MG (1992). An unusual feaytre revealed by the crystal structure at 2.2A resolution of human transforming growth factor- β 2. *Nature.* 358:430-434.
- Shi Jia, Osamu Yoshino, Yutaka Osuga, Kaori Koga, Yasushi Hirota, Emi Nose, Osamu Nishii, Tetsu Yano, Yuji Taketani (2010). Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) Increases Gene Expression of FSH Receptor and Aromatase and Decreases Gene Expression of LH Receptor and StAR in Human Granulosa Cells. *American Journal of Reproductive Immunology* 65 (2011) 421–427.
- Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F & Erickson GF (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews* 25 72–101.
- Solovyeva EV, Hayashi M, Margi K, Barkats C, Klein C, Amsterdam A, Hsueh AJ, Tsafiriri A (2000). Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. *Biol Reprod.* 63:1214–1218.

- Souza CJ, Campbell BK, McNeilly AS and Baird DT (2002) Effect of bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. *Reproduction* 123, 363–369.
- Spicer L.J, P.Y Aad, Allen D, S. Mazerbourg, A J. Hsueh (2006). Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *Journal of Endocrinology* 189, 329-339.
- Stocco D (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Ann Rev Physiol.* 63:193-213
- Strauss J III, Kallen C, Christenson L, Watari H, Devoto L, Arakane F and Kiriakidou M (1999). The steroidogenic acute regulatory protein (StAR): a window into the complexities of intracellular cholesterol trafficking. *Rec Prog Horm Resear.* 54:394.
- Suzuki A, Kaneko E, Maeda J and Veno N (1997). Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun.* 232:153-156.
- Teixeira Filho FL, Baracat EC, Lee TH, Suh CS, Matsui M, Chang RJ, Shimasaki S and Erickson GF (2002) Aberrant expression of growth differentiation factor-9 in oocytes of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 1337–1344.
- ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldi CH and Miyazono K (1993). Activin receptor- like kinases: a novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/ threonine kinase activity. *Oncogene.* 8:2879-2887.
- Tsuchiya Y, Nakajima M and Yokoi T (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Canc Lett.* 227:115-124.
- Vander, Sherman, Luciano (2003). *Human Physiology: The mechanisms of body function.* McGraw Hill Lange, 9th edition.

- Vanderhyden BC, Macdonald EA, Nagyova E and Dhawan A (2003) Evaluation of members of the TGF- β superfamily as candidates for the oocyte factors that control mouse cumulus expansion and steroidogenesis. *Reproduction (Suppl 61)*,55–70.
- Vitt UA, Hsu SY and Hsueh AJW (2001). Evolution and classification of cystine knot-containing hormones and related extracellular signaling molecules. *Mol Endocrinol.* 15:681-694.
- Vitt UA, Mazerbourg S, Klein C, Hsueh AJ (2002). Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod* 67:473–480
- von Bubnoff A and Cho K WY (2001). Intracellular BMP signaling regulation in vertebrate pathway or network? *Dev Biol.* 239:1-14
- Wang EA, Rosen V, D' Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, Luxenberg DH, McQuid D, Moutsatsos IK, Nove J and Wozney JM (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:2220-2224.
- Wang J and Roy SK (2004). Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 70, 577–585.
- Wozney JR and Rosen V (1998). Bone morphogenetic proteins and the bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop Rel Res.* 346:26-37.
- Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF and Massague J (1992). TGF- β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell.* 71:1003-1014.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. & Massague, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature*, 370, 341-347.
- Yamamoto N, Christenson LK, McAllister JM, Strauss JF III (2002). Growth

differentiation factor-9 inhibits 3',5'-adenosine monophosphate-stimulated steroidogenesis in human granulosa and theca cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:2849–2856.

Yen SSC (1977). Regulation of the hypothalamic- pituitary- ovarian axis in women. *J Reprod Fert.* 51:181-191.

Yu PB, Beppu H, Kawai N, Li E and Bloch KD (2005). Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 280:24443-24450.

Zeisberg M and Kalluri R (2008). Reversal of experimental renal fibrosis by BMP7 provides insights into novel therapeutic strategies for chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 23:1395-1398.

Zhang H, Bradley A (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* 122:2977–2986.

Ελληνική βιβλιογραφία

Μεσσήνης ΙΕ (2005). Επιομή: Μαιευτική & Γυναικολογία. MD communications. Αθήνα. Κεφ 1-4. Σελ 15-50.